

Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

55. BAND, 2. HEFT

MIT 122 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 6. SEPTEMBER 1961)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z.
Zellforsch.

Preis DM 54.80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von R. Goldschmidt und W. von Möllendorff. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von W. von Möllendorff und J. Seiler, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von Max Schultze; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von v. La Valette St. George, W. Waldeyer; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von W. Roux, H. Braus, H. Spemann.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F I,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberg Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

55. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft Seite

HAGER, G., Über das Vorkommen von Lamellenkörperchen im adventitiellen Gewebe des Interdigitalorganes des Rehes. Mit 3 Textabbildungen	143
FERNER, H., und H. GANSLER, Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Glandula submandibularis und parotis des Menschen. Mit 22 Textabbildungen . . .	148
YAMORI, T., S. MATSUURA and S. SAKAMOTO, An electron-microscopic study of the normal and stimulated adrenal cortex in the rat. With 18 Figures in the Text . . .	179
SZABO, T., Rapports ontogénétiques entre l'organe électrique, son innervation et sa commande encéphalique (<i>Mormyrus rume</i>). Avec 4 Figures dans le Texte . . .	200
YOSHIMURA, F., und M. IRE, Licht- und elektronenmikroskopische Studie an den Kristalloiden in der Schilddrüsenzelle. Mit 16 Textabbildungen	204
DAVID, H., Zur Morphologie der Leberzellmembran. Mit 12 Textabbildungen	220
HELLMAN, B., C. HELLERSTRÖM, S. LARSSON and S. BROLIN, Histochemical observations on the pancreatic islets in normal and obese-hyperglycemic mice. With 7 Figures in the Text	235
STEGNER, H.-E., Das Epithel der Tuba uterina des Neugeborenen. Elektronenmikroskopische Befunde. Mit 9 Textabbildungen	247
VIRÁGH, Sz., et A. PORTE, Structure fine du tissu vecteur dans le cœur de rat. Avec 16 Figures dans le Texte	263
VIRÁGH, Sz., et A. PORTE, Elements nerveux intracardiaques et innervation du myocarde. Étude au microscope électronique dans le cœur de rat. Avec 15 Figures dans le Texte	282

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Aus dem Institut für Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Hochschule in Wien
(Vorstand: Prof. Dr. JOSEPH BODINGBAUER)

ÜBER DAS VORKOMMEN VON LAMELLENKÖRPERCHEN IM ADVENTITIELLEN GEWEBE DES INTERDIGITALORGANES DES REHES

Von

GERHARD HAGER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Februar 1961)

Im Verlaufe von Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob in bestimmten Territorien der Hinterextremitäten von Rehen art- und geschlechtsspezifische Merkmale nachzuweisen sind, wurden in Serienschnitten aus der Region des Klauenspaltes, in unmittelbarer Umgebung des Klauensäckchens, bei beiden Geschlechtern in allen daraufhin geprüften Fällen Lamellenkörperchen vom Typ der Vater-Pacinischen Organe gefunden.

Aus der Literatur sind ungefähr 50 verschiedene, ständige Fundorte dieser Lamellenkörperchen bei Mensch und Tier bekannt. Es liegt nicht in der Absicht des Autors, einen weiteren Fundort dieser Terminalorgane besonders hervorzuheben. Vielmehr sollen aus der charakteristischen Position der Organe und im Hinblick auf ihre bisher beschriebenen Funktionen (SCHUHMACHER 1911, CLARA 1925, WEDDELL 1945, HENSEL 1952, AUTRUM 1961) Schlußfolgerungen bezüglich der „Trittsicherheit“ des Rotwildes gezogen werden.

Die enge räumliche Beziehung der Lamellenkörperchen zu Gelenken läßt als gesichert erscheinen, daß sie das versorgte Gebiet für Bewegungsreize sensibilisieren. Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen von ADRIAN und UMRATH (1929) und v. FREY (1929) sprechen einwandfrei für eine solche Annahme.

Das Interdigitalorgan (Abb. 1): Bei zahlreichen kleinen Wiederkäuern finden sich an den Extremitäten zwischen den Klauen umfangreiche, gut abgegrenzte Drüsenlager. Ihre formenreichen Drüsenpakete ordnen sich beim Reh in den Wänden eines bundschuhförmigen Säckchens an und treten nur an den Hinterläufen auf (SCHAFFER 1940). Sie reichen zwischen dem ersten Zehnglied auffallend weit proximal (HABERMEHL 1958). Dem Lumen benachbart finden sich hauttalgdrüsenähnliche Zellformationen, während die Säckchenaußenseite von Schlauchdrüsen besetzt ist. Im ersten Lebensjahr, (vom 6. bis zum 8. Monat), erreicht das Klauensäckchen nach meinen Beobachtungen seine definitive Größe; die Dicke der Wand nimmt aber später noch zu.

Das grau- bis rotbraune, fettige Sekret dieser Hautdrüsen hat einen penetranten Geruch. Es ist für die „süße“ Rehfährte (RAESEFELD 1956, 1957) verantwortlich. Da dem Hirsch dieses Duftorgan fehlt, springen unerfahrene Jagdhunde bei einer Kreuzung der Fährten leicht von der verfolgten Hirschfährte auf die intensivere Rehfährte über (SCHUHMACHER 1911, SCHAFFER 1938).

Gegen die der Drüse hypothetisch unterstellte Aufgabe der Klauenfettung wendet SCHAFFER (1936) ein, daß die Drüse auch bei dem in feuchten Bergwäldern lebenden Tahr vorkommt. Es kann aber ebenso das Fehlen des Klauensäckchens beim Hirsch, der unter ähnlichen klimatischen Bedingungen wie das Reh lebt, mit Erfolg als Argument herangezogen werden.

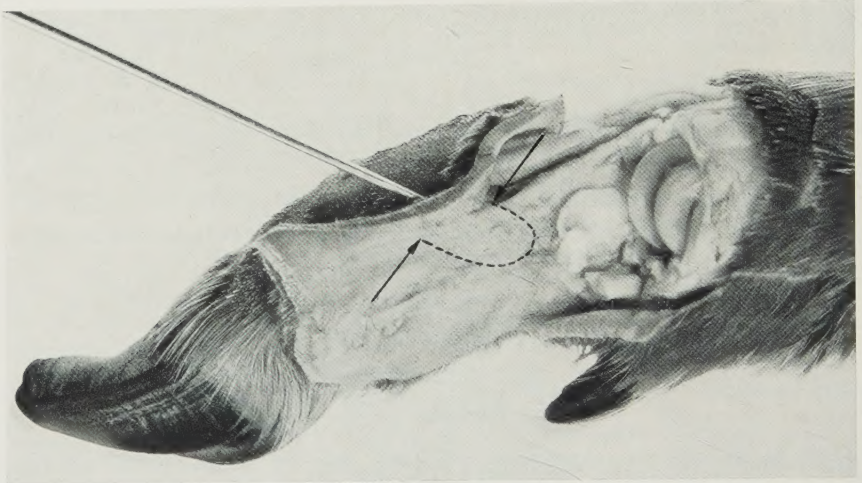


Abb. 1. Linke Hinterextremität eines Rehes. Laterale Klaue entfernt. Die gestrichelte Linie gibt die Grenze des Interdigitalorganes an. Proximal und distal von Klauensäckchen, durch Pfeile angedeutet, die Lage V.P.L.K. Teilungsstelle der Vv. digit. pedis dors. III lat. et IV med. (im Vordergrund). Die mediale Zehe zeigt als Zufallsbefund einen erworbenen steilen Huf und eine starke Verlagerung der Ballenregion

Material und Technik

Routineuntersuchungen am Klauenspalt und Klauensäckchen der Hinterextremitäten von 16 Rehen (11 männlich, 5 weiblich) verschiedenen Alters. Zelloidinserienschnitte, 8μ dick, mit einem Schnittabstand von 48μ . H.E.- und Elastika-Färbung nach PRANTER. Ferner wurden zum Vergleich Pankreasschnitte von 12 Katzen untersucht.

Befunde

Im Areal zwischen den Endsehnern des oberflächlichen Kopfes des M. extensor digitalis pedis longus, distal von der Aufteilung der A. digitalis pedis communis dorsalis III in die mediale Seitenarterie der lateralen Zehe und die laterale Seitenarterie der medialen Zehe (Aa. digiti pedis quarti medialis et tertii lateralis) liegen im perivaskulären Bindegewebe Lamellenkörperchen (Vater-Pacini) Abb. 2 in wechselnder Anzahl. Fast stets finden sich Doppelbildungen mit einer gemeinsamen, bindegewebigen Kapsel. Die Organe repräsentieren den Kleintyp mit wenigen Außenlamellen. Ihre Größe variiert zwischen 200 und 450μ ; sie erscheinen vielgestaltig.

Das gehäufte Auftreten von zusammengesetzten Lamellenkörperchen (Abb. 3), die nach SCHUHMACHER (1911) infolge ihrer morphologischen Eigenheiten als besonders sensibel gegenüber Drucksteigerungen anzusehen sind, im Klauenspalt erschien mir bemerkenswert. Die Wandung des Säckchens, das durch die Aktion der vorbeiziehenden Sehnen gerade bei forcierter Bewegung eine verstärkte Massage erfährt, wird mit fortschreitendem Alter verdickt; die prallen Drüsenpakete buchten die bindegewebige Kapsel gegen das lockere Gewebe der Umgebung vor. Auch ist die Größe des Säckchens nach HODGSON (1847) periodischen Schwankungen unterworfen. Die Unnachgiebigkeit der hier verlaufenden Sehnen und das pralle Interdigitalorgan bewirken räumliche Enge. Ein verstärkter Blutzufuß in die tätige Extremität könnte Druckveränderungen schaffen, die die empfindlichen Terminalorgane zu erregen vermögen.

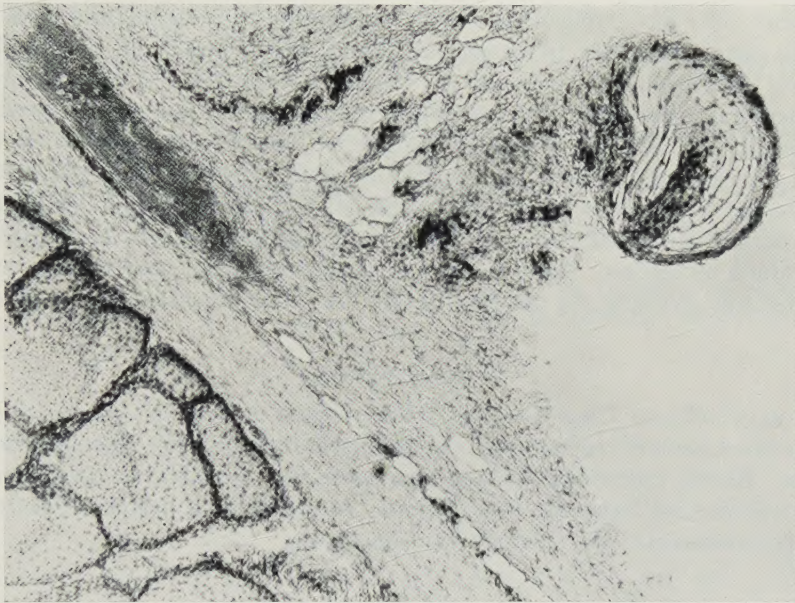


Abb. 2. Rehbock 6; Alter: 7—8 Monate. Lamellenkörperchen, dem Interdigitalorgan in der linken, unteren Bildecke unmittelbar angelagert. Die Binnenräume der inneren Lamellenlagen relativ weit. (Sämtliche Aufnahmen mit Objektiv 4,5 und Oc. Plan 8 ×)

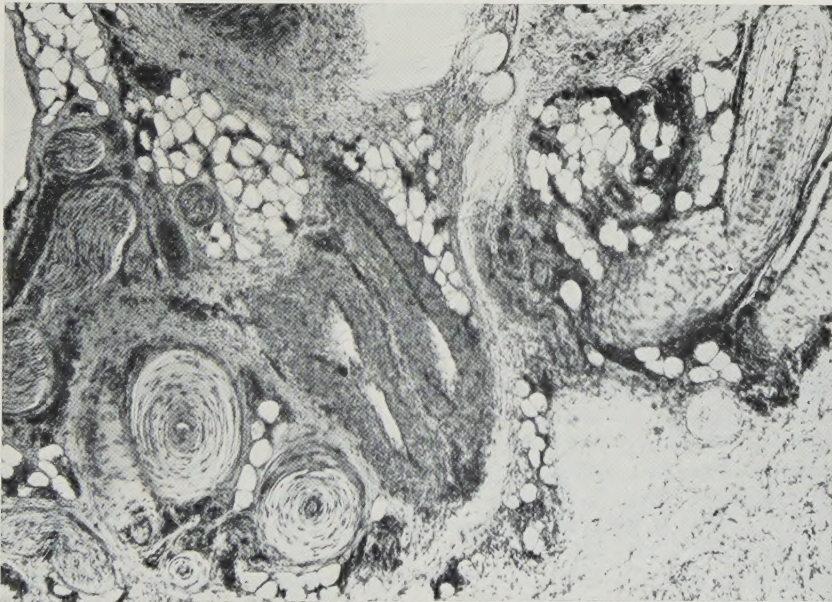


Abb. 3. Geiß 2; Alter unbekannt. 6 Lamellenkörperchen in unmittelbarer Nachbarschaft des Interdigitalorgans, davon zwei Paare („zusammengesetzte Lamellenkörperchen“)

Eine „intensive“ sensible Versorgung der Hinterextremität ist für das langbeinige Rotwild von eminenter Bedeutung. Vor allem kann die Aktion des

fliehenden oder des „treibenden“ bzw. „getriebenen“ Tieres dadurch wesentlich sicherer gestaltet werden. In Situationen (Panik oder Brunft), in denen die physiologische Reaktionsweise verändert ist, können Rezeptoren, die Wahrnehmungen über Bewegungen und Stellungen der Phalangen vermitteln und entsprechend rasch Impulse an den Bewegungsapparat weiterleiten, ausgleichend und korrigierend wirken. Die geringe Trägheit des Drucksinnes stellt ein zusätzliches, unterstützendes Moment dar. Es erscheint mir gerechtfertigt, die Lokalisation der Lamellenkörperchen in der beschriebenen Region mit der „Trittsicherheit“ des Rotwildes in Verbindung zu bringen. Untersuchungen an Extremitäten von Antilopinen und Capriden zur Prüfung der Stichhaltigkeit des Vorgebrachten sind vorgesehen.

Zusammenfassung

In unmittelbarer Umgebung des Klauensäckchens des Rehes finden sich bei beiden Geschlechtern regelmäßig Lamellenkörperchen vom Typ Vater-Pacinischer Organe. Häufig überwiegen die zusammengesetzten Terminalorgane, denen eine besonders niedrige Reizschwelle zukommt. Diesen Befund bringt der Autor mit der „Trittsicherheit“ der Rehe in Zusammenhang.

Literatur

- ADRIAN, E. D., and K. UMRATH: The impulse discharge from the Pacinian corpuscle. *J. Physiol. (Lond.)* **68**, 139—154 (1929/30).
- AUTRUM, H.: Die Arbeitsweise einzelner Sinneszellen. *Naturw. Rdsch.* **14**(2), 53—60 (1961).
- BRINKMANN, A.: Die Hautdrüsen der Säugetiere. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* **20**, 1173—1231 (1912).
- CLARA, M.: Über den Bau des Schädels der Waldschnepfe. Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Herbstschen Körperchen und zur Funktion der Lamellenkörperchen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **3**, 1—37 (1925).
- FREY, M. v.: Die Haut als Sinnesfläche. In: *Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten*, Bd. I/2, S. 91ff. Berlin 1929.
- GRAY, J. A. B., and M. SATO: Properties of the receptor Potential in pacinian corpuscles. *J. Physiol. (Lond.)* **122**, 610—636 (1953).
- HABERMEHL, K.: Morphologische Unterschiede zwischen Vorder- u. Hinterlauf beim Reh. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* **71**, 89—94 (1958).
- HENSEL, H.: Physiologie der Thermoreception. *Ergebn. Physiol.* **47**, 212—224 (1952).
- , and Y. ZOTTERMANN: The response of mechanoreceptors to thermal stimulation. *J. Physiol. (Lond.)* **115**, 16—25 (1951).
- HODGSON, B. H.: On various genera of ruminants. *Calcutta J. nat. hist.* **16**, 685—711 (1847).
- JALOWY, B.: Über die Entwicklung der Nervenendigungen in der Haut des Menschen. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **109**, 344—359 (1939).
- KRÖLLING, O.: Über Bau, biologische und phylogenetische Bedeutung der Inguinalorgane bei den Gazellen. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **91**, 553—579 (1930).
- PEASE, D. C., and T. A. QUILLIAM: Electronmicroscopy of the Pacinian corpuscle. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 333—347 (1957).
- QUILLIAM, T. A., and M. J. SATO: Nerve fibres from Pacinian corpuscles. *J. Physiol. (Lond.)* **129**, 167—176 (1955).
- RACHMATULLIN, Z. CH.: Die Entwicklung der Meißnerschen Körperchen in der Menschenhaut. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **40**, 445—456 (1936).
- RAESFELD, F. v.: Das Rehwild, IV. Aufl. Herausgeg. von G. v. LETTOW-VORBECK u. W. RIECK. Berlin u. Hamburg: Paul Parey 1956. Das Rotwild, IV. Aufl. Herausgeg. von F. VORREYER. Berlin u. Hamburg: Paul Parey 1957.

- RONGE, H.: Altersveränderungen der Meißnerschen Körperchen in der Fingerhaut. Z. mikr.-anat. Forsch. **54**, 167—177 (1943).
- SCHAFER, J.: Die Hautdrüsen der Säugetiere, S. 344ff. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1940.
- Rehfährt und Hund. Z. mikr.-anat. Forsch. **43**, 15/16 (1938).
- SCHUHMACHER, S. v.: Beiträge zur Kenntnis des Baues und der Funktion der Lamellenkörperchen. Arch. mikr. Anat. **77**, 157—193 (1911).
- SCHWARZ, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Außenkolben der Vater-Pacinischen Körperchen. Z. Zellforsch. **36**, 436—447 (1951).
- WEDDELL, GR.: The anatomy of cutaneous sensibility. Brit. med. Bull. **3**, 733—774 (1945).

Dr. GERHARD HAGER,
Wien III, Österreich, Linke Bahng. 11

Aus dem Histologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. H. FERNER) und der Elektronenmikroskopischen Abteilung (Leiterin: Priv.-Doz. Dr. med. H. GANSLER) der Universität des Saarlandes

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER GLANDULA SUBMANDIBULARIS UND PAROTIS DES MENSCHEN*

Von

H. FERNER und H. GANSLER

Mit 22 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1961)

I. Einleitung und Literatur

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Mundspeicheldrüsen sind außerordentlich spärlich. Sie beziehen sich auf die Drüsen von Nagern (Ratte, Maus, Meerschweinchen) und fehlen für den Menschen bis auf einzelne Abbildungen vollkommen.

Unsere Beobachtungen erstrecken sich auf die Parotis und Submandibularis des erwachsenen Menschen. Es wird deutlich, daß neben Gemeinsamkeiten auch Unterschiede gegenüber den bisher bekannten Ergebnissen bei Nagern bestehen, was schon nach den Erkenntnissen der Lichtmikroskopie nicht anders zu erwarten war.

Bisher liegen elektronenmikroskopische Untersuchungen an Speicheldrüsen von GAUTIER und DIOMEDE-FRESA (1953), VAN DEN HOFF (1957), HOFMANN (1959), SCOTT und PEASE (1959) und SCHWARZ und HOFMANN (1960) vor.

GAUTIER und DIOMEDE-FRESA (1953) beschreiben die Parotis und Submandibularis junger Ratten, die entweder unbehandelt waren oder Pilokarpin erhalten hatten. Zwischen Parotis- und Pankreaszellen fanden die Autoren keine wesentlichen Unterschiede. Die basophile Substanz beider Zellarten wurde beschrieben als Ergastoplasmafäden oder Chromidien, die einzeln oder geschichtet vorkommen, wobei sie Wirbel-, Geflecht- oder Parallelanordnung erkennen lassen. In den mukösen Drüsenzellen der Submandibularis finden die Autoren Basalfilamente, die viel feiner sind als die Ergastoplasmafäden in der Parotis. Nach Pilokarpin-injektion werden Veränderungen des Ergastoplasmas in seiner Anordnung und Ausdehnung geschildert. Die Autoren nehmen direkte Übergänge von Chromidien in Sekretvakuolen an. Eine Beziehung zwischen Mitochondrien und Sekretgranula konnten sie nicht beobachten. Der Befund, daß das Ergastoplasma aus Filamenten oder Fibrillen aufgebaut sei, erklärt sich aus der damals noch angewandten Einbettungstechnik mit Esterwax. Nach Einführung der Einbettung in Methacrylat konnten die Befunde insofern revidiert werden, als sich auch das Ergastoplasma als aus Membransystemen bestehend erwies.

Auch die Untersuchungen von HOFMANN (1959) beziehen sich auf die Parotis der Ratte. Das Ergastoplasma besteht aus lamellären Membransystemen, die mit Palade-Granula (Ribosomen) besetzt sind. Als Grundtypen werden auch von ihm lamellär parallele, wirbelartige und geflechtartige Anordnungen unter-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

schieden. Die parallel angeordneten Lamellen, die vorwiegend in den basalen Zellbereichen vorkommen, verlaufen von der Zellbasis apikalwärts bis etwa in Höhe des Zellkerns. Zwischen Zellkern und Apex ist zuweilen eine wirbelförmige Anordnung des Ergastoplasmas zu beobachten. Neben parallel angeordneten Doppellmembranen beschreibt der Autor auch unregelmäßigere Membranstrukturen des Ergastoplasmas, wodurch verschieden große kugelige oder ovoidale Räume entstehen. Diese sollen den lichtmikroskopischen Sekretvakuolen entsprechen. Außerdem fand HOFMANN osmiophile Sekretgranula (Durchmesser $0,5-1 \mu$), die von einer einfachen oder einer doppelten Membran begrenzt werden. Auch diese Granula sollen in den Ergastoplasmalamellen gebildet werden; während ihrer Reifung soll die Osmiophilie abnehmen, die Sekretgranula sollen in Sekretvakuolen transformiert werden. Außerdem könnten osmiophile Sekretgranula in größere Sekretvakuolen eingeschleußt werden. Da in apikalen Zellbereichen sowohl Sekretvakuolen als auch Sekretgranula beobachtet werden, nimmt HOFMANN an, daß Sekretgranula sowohl in der Zelle in Vakuolen transformiert und die Vakuolen ins Lumen ausgestoßen werden als auch ins Lumen abgegeben werden können. Eine Ausstoßung von Sekretgranula in das Drüsenlumen wurde von SIEKEVITZ und PALADE (1958) im Pankreas beschrieben. Nach VAN DEN HOFF (1957) soll die verschieden intensive Osmiophilie der Sekretgranula verschiedenen Reifezuständen entsprechen.

In ähnlicher Weise wie HOFMANN beschreibt SCHWARZ (1960) die Anordnung des Ergastoplasmas in den Parotiszellen der Ratte. Darüber hinaus erörtert er Beziehungen des Kernes zum Ergastoplasma. In der Außenzone des Kernes nahe der Kernmembran befindet sich ein Gürtel von sehr dichter Kernsubstanz, der an einigen Stellen unterbrochen sei. An diesen Lücken ist nach SCHWARZ ein Zusammenhang zwischen einer Doppellamelle und der Kernoberfläche vorhanden. Die Kernvakuolen der Parotis-Drüsenzellen bestehen ebenfalls aus konzentrisch angeordneten Doppellamellen. Einzelne Lamellen treten an einigen Stellen mit der Wand der Kernvakuole und damit mit der umgebenden Kernsubstanz in Verbindung. Darüber hinaus beschreibt SCHWARZ Kernvakuolen in Parotis-Drüsenzellen, die schon lichtmikroskopisch deutlich hervortreten. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigt sich, daß diese ebenfalls aus Doppellmembranen bestehen und dem außerhalb der Kernmembran gelegenen Ergastoplasma sehr ähneln. Die Deutung dieser Kernvakuolen als Zytoplasmaeinstülpungen läge nahe. SCHWARZ neigt aber mehr zu der Vorstellung, daß es sich bei den Kernkugeln um Produkte des Nukleolus handle, die in das Zytoplasma abgegeben werden.

Die wohl bisher eingehendste elektronenmikroskopische Studie aller drei großen Speicheldrüsen der Ratte veröffentlichten SCOTT und PEASE (1959). Die Zellen der Parotis-Endstücke enthalten in dem dichten Zytoplasma kleine Nester von Golgi-Vakuolen und zwei Typen von Sekretgranula mit allen Übergängen. Der eine Typ hat eine distinkte Membran und eine homogen-flockige Matrix, beim zweiten Typ besteht der sehr dichte Inhalt aus eng gepackten Partikeln. Sie sollen verschiedenen Stadien der Reife entsprechen, weil alle Übergänge zu beobachten sind. Der erste Typ sei die Speicherphase, bei der manchmal die Zellen vom Apex bis zur Basis von Granula erfüllt sind, beim zweiten Typ sind die Granula immer nur apikal und in geringer Zahl vorhanden. Abgeflachte

Zisternen in parallelen Reihen repräsentieren das endoplasmatische Retikulum; Mitochondrien sind spärlich verteilt. In den interzellulären Raum ragen Mikrovilli hinein; auch die basalen Partien der Zellen zeigen oft ähnliche Zotten. In den Acini der Parotis finden sich keine myoepithelialen Zellen.

In der Sublingualis haben die serösen Zellen der Halbmonde ebenfalls ein reichliches endoplasmatisches Retikulum mit RNA-Granula, aber zum Unterschied von den Parotiszellen nur wenige Sekretgranula, die dem dichten Typ entsprechen, aber kleiner und homogener sind. Der Golgi-Apparat ist spärlich.

Die Ultrastruktur der mukösen Zellen ist sehr ähnlich der Becherzellen. Das Sekretionsprodukt kann direkt zum Golgi-Apparat zurückverfolgt werden.

Die Masse des Zytoplasmas findet sich basal und lateral, während die mukösen Massen das Zentrum und die apikale Region einnehmen. Zahlreiche Mitochondrien finden sich basal, der Golgi-Apparat liegt in der Grenzzone zwischen Zytoplasma und mukösen Massen. Die Sekretmassen sollen nach den Autoren so entstehen, daß die einzelnen Lamellen erweitert werden und vesikulären Charakter annehmen. Diese Vakuolen werden als die Vorläufer der Sekretgranula aufgefaßt. Sie haben zunächst noch eine Membran, welche aber mit dem Größerwerden der Granula verschwindet. Die einzelnen Vakuolen fließen zu einer einheitlichen, von schmalen Zytoplasmastreifen durchsetzten Masse zusammen; möglicherweise beruht dieses Zusammenfließen auf postmortalen oder methodisch bedingten Vorgängen. Myoepitheliale Zellen sind ein regelmäßiger Befund.

Die Acinuszellen in der *Glandula submaxillaris der Nager* sind bekanntlich sowohl von den serösen als auch den mukösen Zellen der beiden anderen Speicheldrüsen verschieden.

Die Schaltstücke aller drei großen Speicheldrüsen haben eine weitgehend einheitliche Struktur. Ihre Epithelzellen enthalten eine geringe Zahl von spezifischen Granula, was für ihre sekretorische Leistung spricht. Die Granula sind massendicht und homogen. Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Material sind minimal ausgebildet.

Das Epithel der Sekretrohre oder Streifenstücke aller drei Speicheldrüsen zeigt übereinstimmend eine bemerkenswerte Spezialisierung der basalen Zelloberfläche. Apikal sieht man in den Zellen kleine Granula als Zeichen einer sekretorischen Aktivität. Die basale Zelloberfläche ist durch tiefe Einfaltungen ausgezeichnet, zwischen denen die Mitochondrien angeordnet sind; es handelt sich um das Substrat der „Basalstreifung“. Eine derartige Spezialisierung der basalen Plasmamembran haben zuerst SjöSTRAND und RHODIN (1953) in den proximalen Abschnitten der Nierenkanälchen beschrieben. PEASE (1956) beschreibt ähnliche Verhältnisse für alle Epithelzellen, bei denen der Wassertransport eine besondere Rolle spielt: Niere, Plexus chorioideus, Ziliarkörperepithel und Stria vascularis in der häutigen Schnecke.

Myoepitheliale Zellen fanden sich bei der Ratte nur in den Acini der Sublingualis und Submaxillaris — hier spärlicher —, während sie in der Parotis und in den Gängen überhaupt nicht vorkamen. Die fibrilläre Struktur des Zytoplasmas haben sie mit den typischen glatten Muskelzellen gemeinsam; sie sind jedoch ohne sarkolemmale Zwischenschicht den Drüsenzellen unmittelbar angelagert. Pinozytotische Bläschen, in den Muskelzellen reichlich vorhanden, sind spärlich oder fehlen in den myoepithelialen Zellen ganz.

II. Material und Methode

Operationsmaterial von menschlicher Submandibularis und Glandula parotis wurde lebensfrisch in 1%iger gepufferter isotonischer OsO_4 -Lösung 1 Std bei 4° C fixiert (CAULFIELD 1957). Nach Entwässerung über aufsteigende Alkoholreihe wurde das Gewebe in Butyl-Methyl-Methacrylat 9:1 eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Porter-Blum-Mikrotom hergestellt. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stand ein Siemens-Elmiskop I zur Verfügung.

III. Befunde

1. Die serösen Drüsenzellen

Schon lichtmikroskopisch ergibt der Vergleich von serösen Drüsenzellen ein und desselben Acinus der Parotis oder Submandibularis an guten gefärbten Dauerpräparaten bei Immersionsvergrößerung einen unterschiedlichen Aspekt. Die Mehrzahl der serösen Drüsenzellen weist eine feine vakuoläre Struktur des supranukleären und apikalen Zytoplasmas auf. Die Vakuolen werden in der Regel als Prosekretvakuolen gedeutet. In anderen weniger zahlreich anzutreffenden serösen Drüsenzellen finden sich zwischen den Vakuolen intensiv gefärbte Granula in größerer oder geringerer Dichte, Prosekretgranula; sicherlich kommen auch granuläre Mitochondrien zur Darstellung. Bei anderen Drüsenzellen ist der apikale Zellteil optisch leer oder von wenigen Gerinnseln erfüllt, während die Zellmembran gut gefärbt erscheint.

Bei der vorliegenden Studie beschränken wir uns auf die Beschreibung der Strukturen, ohne Vorstellungen über die Entstehung und den Sekretionsmechanismus der Prosekretgranula bzw. der Prosekretvakuolen zu erörtern. Über diese Frage werden wir uns später äußern.

Die Abb. 1 zeigt einen serösen Acinus der Submandibularis des erwachsenen Menschen, einen Querschnitt, der vornehmlich die apikalen Zellabschnitte mit dem Acinuslumen und den interzellulären Sekretkapillaren wiedergibt. Wie auf Längs- und Querschnitten der Sekretkapillaren zu sehen ist, ragen zahlreiche fingerförmige Mikrovilli in die Lichtung hinein; sie sind im Acinuslumen plumper und spärlicher. In den basalen Zellregionen fallen parallel angeordnete Lamellensysteme des endoplasmatischen Retikulums auf, die keine Beziehung zur basalen Zellmembran erkennen lassen. Gelegentlich ist eine Wirbelanordnung oder konzentrische Schichtung der Ergastoplasmalamellen zu beobachten. Im allgemeinen ist dieses Ergastoplasma spärlicher als in den entsprechenden Drüsenzellen der Ratte. Zwischen den Lamellen liegen ebenso, wie im übrigen Zelleib, einzelne Mitochondrien. Besonders die apikalen, aber auch die supranukleären Teile der serösen Drüsenzellen sind von zahlreichen Prosekretvakuolen mit charakteristischer Struktur erfüllt. Diese Prosekretvakuolen sind im allgemeinen in Kernnähe größer als in der Nähe des Lumens und entlang den interzellulären Sekretkapillaren. Dieser Umstand ist schlecht mit der Vorstellung in Einklang zu bringen, daß sich die Prosekretvakuolen lumenwärts durch Zusammenfließen vereinigen und vergrößern sollen. Die Prosekretvakuolen sind kugelig oder ovoid; der Durchmesser der größten überschreitet 2μ nicht. In der Regel liegt ihr Durchmesser unter 1μ . Die meisten Prosekretvakuolen sind durch eine einfache, glatt oder wellig verlaufende osmiophile Membran von etwa 150 \AA Dicke gegen das Hyaloplasma abgegrenzt (Abb. 2).

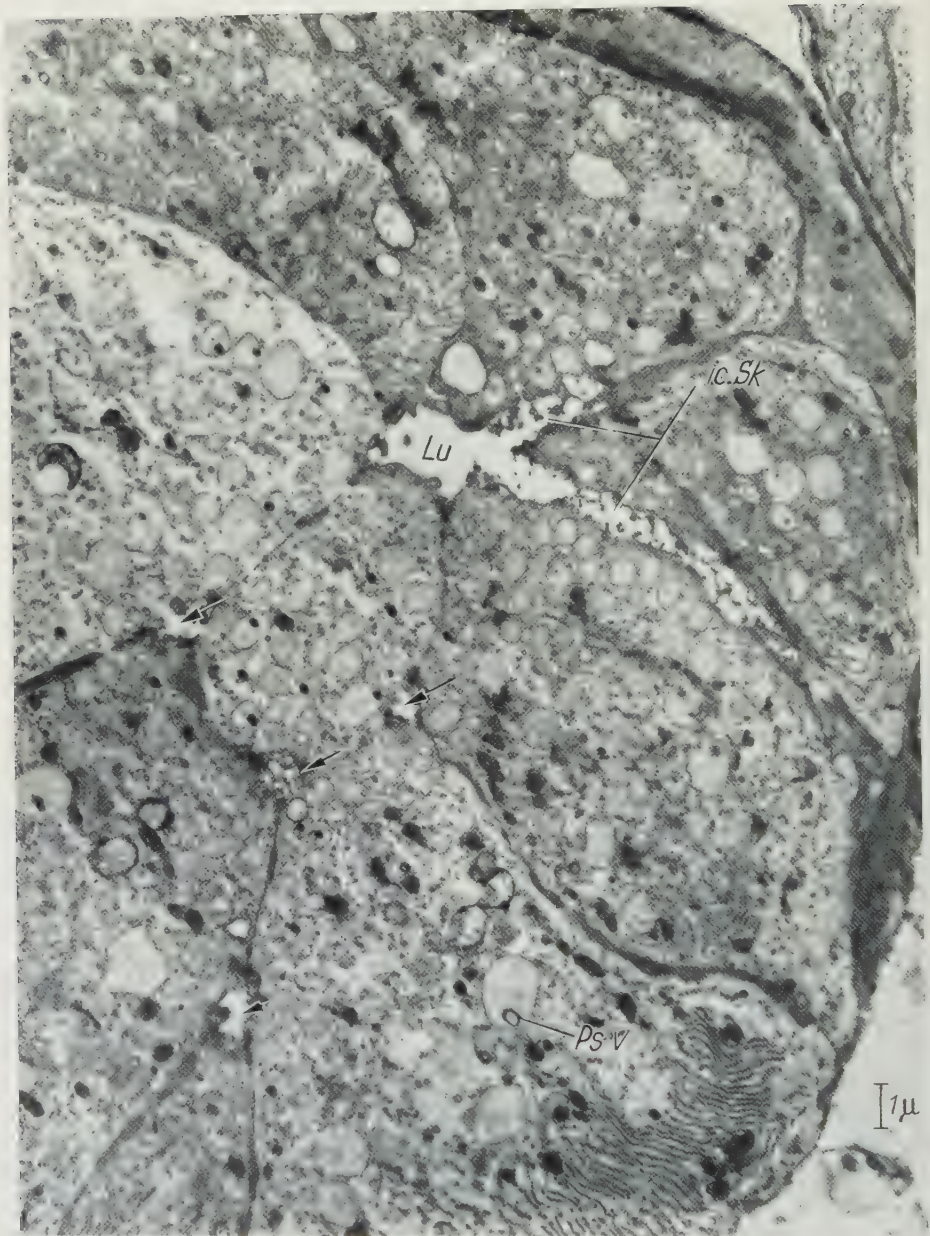


Abb. 1. Submandibularis, Mensch. Seröse Drüsenzellen eines Acinus. Prosekretvakuolen mit Innenkörperchen. *Lu* Lumen; *ic. Sk.* Interzelluläre Sekretkapillaren im Längs- und im Querschnitt (Pfeile); *Psr.* Prosekretvakuole mit ringförmigem Innenkörperchen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 7500 \times (Arch.-Nr. 3107/60)

Ein auffallendes Merkmal der Prosekretvakuolen ist ein elektronenoptisch sehr dichtes Innenkörperchen, das stets exzentrisch gelegen ist und oft der Vakuolenmembran anliegt. Seine Größe hat keine Beziehung zum Durchmesser der Prosekretvakuolen; sie schwankt zwischen der Hälfte und einem Zehntel des

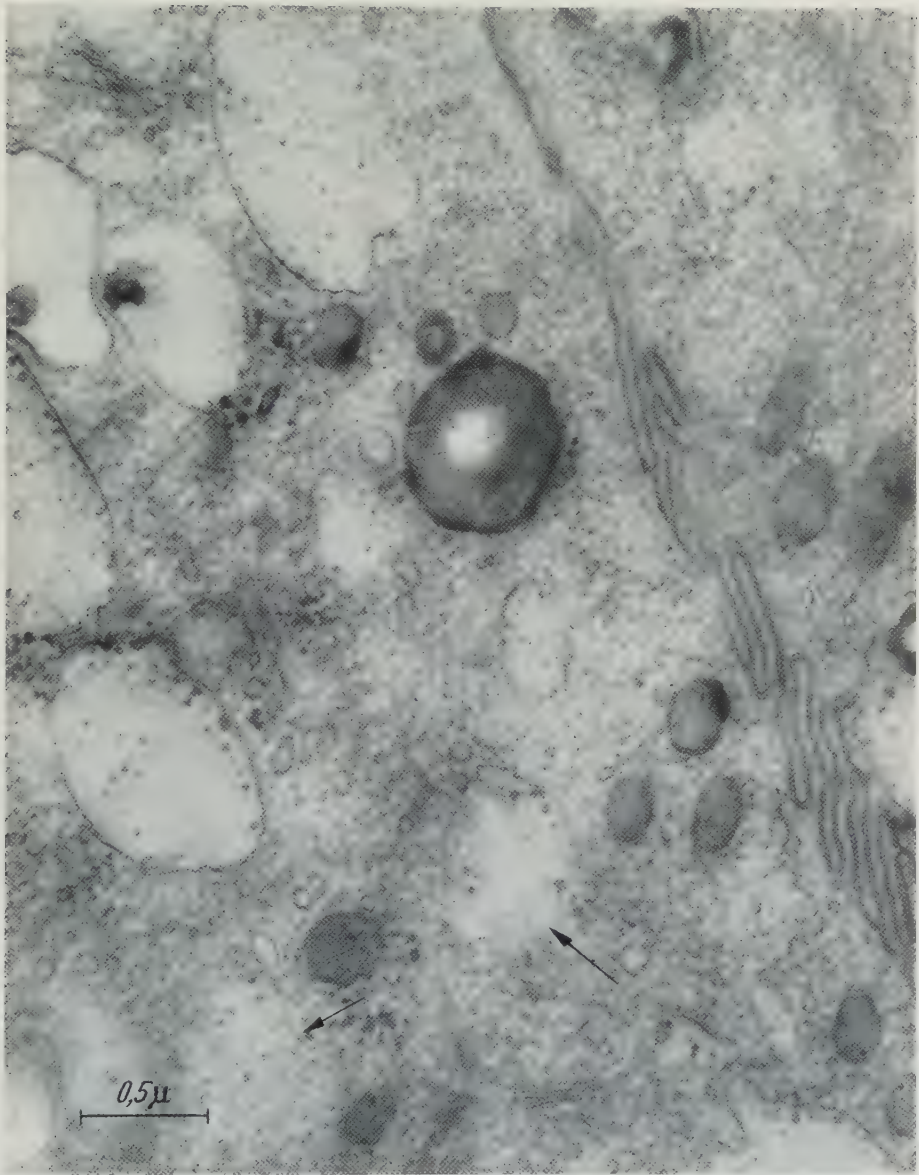


Abb. 2. Submandibularis, Mensch. Teil zweier seröser Drüsenzellen. Prosekretvakuolen mit und ohne Innenkörperchen. Beachte die Prosekretvakuolen (Pfeil) ohne Grenzmembran und die blattförmigen Einfaltungen der Zelloberfläche. Im Hyaloplasma zahlreiche Bläschen unterschiedlicher Größe und Dichte. In der Mitte osmiophile Kugel, wahrscheinlich Fetttropfen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung $15\,000\times$, Abbildung $45\,000\times$ (Arch.-Nr. 3106/60)

Vakuolendurchmessers. Das Innenkörperchen ist kugelig, ovoid oder auch unregelmäßig gestaltet. In den meisten Fällen ist es scharf begrenzt; nur gelegentlich geht seine Substanz kontinuierlich in den Vakuoleninhalt über. Nicht selten zeigt ein Schnitt durch das Innenkörperchen eine zentrale Aufhellung, so daß

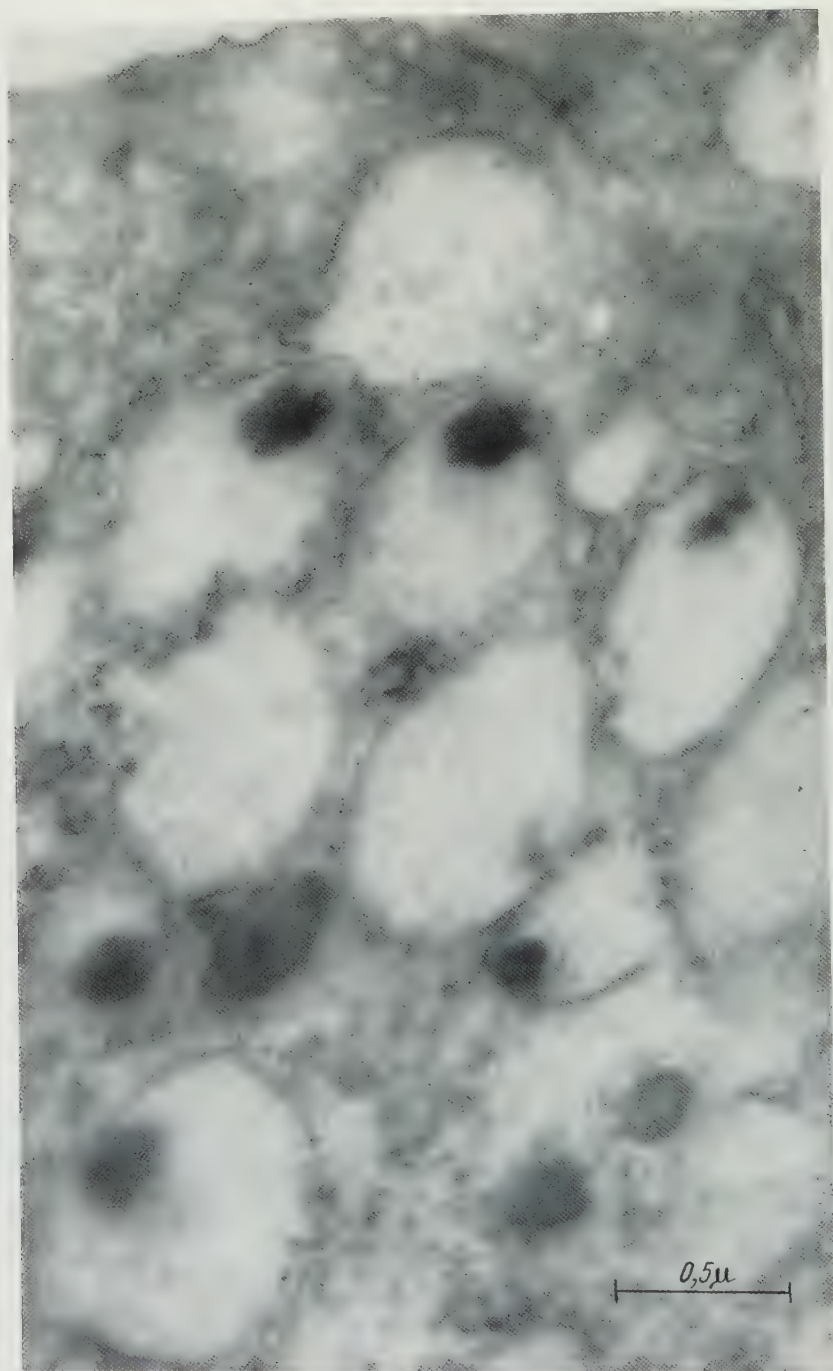


Abb. 3. Submandibularis, Mensch. Ausschnitt aus zwei serösen Drüsenzellen. Zahlreiche Prosekretvakuolen mit dichten randständigen osmiophilen Innenkörpern, die teilweise diffus in den kontrastarmen Vakuoleninhalt überzugehen scheinen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung $15\,000\times$
Abbildung $45\,000\times$ (Arch.-Nr. 3104/60)

Ringfiguren entstehen. Daß nicht alle Prosekretvakuolen derartige Innenkörperchen aufweisen, beruht möglicherweise auf der Schnittführung. Jedoch ist nicht auszuschließen, daß einige Prosekretvakuolen der Innenkörperchen entbehren könnten.

Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 2, 3) ist die teils glatte, teils gewellte Membran der Prosekretvakuolen deutlich zu erkennen. Der Inhalt der Vakuolen unterscheidet sich vom Hyaloplasma durch geringere Dichte. Man sieht außer den Innenkörpern feine Netzstrukturen und relativ kontrastreiche kleine Körnchen, welche besonders in der Nähe der Membran lokalisiert sind. Im unteren Bildteil der Abb. 2 erkennt man mehrere unscharf begrenzte Aufhellungen des Zytoplasmas mit einer ähnlichen Feinstruktur wie die Prosekretvakuolen, jedoch *ohne* distinkte Membran. Das stellenweise Fehlen einer Membran kann als Schnitteffekt (Flachschnitt) gedeutet werden. Es sind indessen auch membranlose Komplexe vorhanden, die Entstehungs- oder Auflösungsstadien von Prosekretvakuolen entsprechen könnten. Weiter ist darauf hinzuweisen, daß in der Umgebung der Prosekretvakuolen mit und ohne Membran sehr dicht gepackte Bläschen und Röhrenquerschnitte vorkommen, welche in ihrer Gesamtheit die Zytomembranen repräsentieren.

Indessen zeigt die Feinstruktur der Prosekretvakuolen in den verschiedenen serösen Drüsenzellen nicht unerhebliche Unterschiede bzw. Abweichungen von dem beschriebenen Typus. So finden sich Acini bzw. Drüsenzellen mit besonders „hellen“ Prosekretvakuolen, von denen zumindest die mittelgroßen und kleineren eine distinkte Membran vermissen lassen (Abb. 4). Oft besitzen sie ein dichtes Innenkörperchen mit zentraler Aufhellung. Das Hyaloplasma dieser Zellen ist feingranulär und dichter als das der zuerst beschriebenen Art. Das Gegenstück stellen seröse Drüsenzellen mit „dunklen“ Prosekretvakuolen dar, die von einem elektronenoptisch dichten, homogenen Inhalt erfüllt sind (Abb. 5). Das Grundplasma, das in gleicher Weise an zahlreichen Stellen Golgi-Formationen erkennen läßt, ist ebenfalls dichter als das anderer Zellen und von annähernd gleichem Kontrast wie der Vakuoleninhalt.

Eine Sonderform schließlich stellen Zellen mit weniger, aber ziemlich großen Vakuolen dar, die zum Teil gekammert sind, zum Teil ein sichelförmiges osmio-philis Granulum enthalten. Man wird nicht fehl gehen, wenn man die letzteren Gebilde mit den Halbmondkörperchen von HEIDENHAIN in Zusammenhang bringt.

Auffallend sind ferner die seitlichen Grenzen der serösen Drüsenzellen. Die Zellmembranen zweier benachbarter Zellen sind in Mäanderverlauf tief miteinander verzahnt, greifen also blattartig ineinander (Abb. 2, 3). Zwischen den verfalzten Zellmembranen ist stets ein feiner, annähernd gleichweiter Spalt zu erkennen (s. auch SCOTT und PEASE 1959, seröse Drüsenzellen der Ratte). In der Lichtmikroskopie ergibt die massive Anfärbung der ganzen Breite des Mäanders das Bild der relativ dicken „Zellgrenzen“. Der interzelluläre Kontakt zwischen den Drüsenzellen wird stellenweise auch durch fingerförmige, ineinandergreifende Fortsätze bewerkstelligt (Abb. 6). Die ausgiebige Verzahnung der seitlichen Zellmembranen könnte sowohl für Volumenveränderungen der Zellen als auch für den Zusammenhalt des Zellverbandes von Bedeutung sein. Denkt man an die erheblichen Formveränderungen der großen Speicheldrüsen im Zuge des Kauaktes, die sich schließlich an den einzelnen Acini und Zellen auswirken

müssen, so erscheint die Verzahnung des Zellverbandes in den elementaren Baueinheiten, der Acini, verständlich.

Die Elektronenmikroskopie vermochte einige Aufschlüsse über die interzellulären Sekretkapillaren der Acini zu geben. Es handelt sich um Röhrenchen,

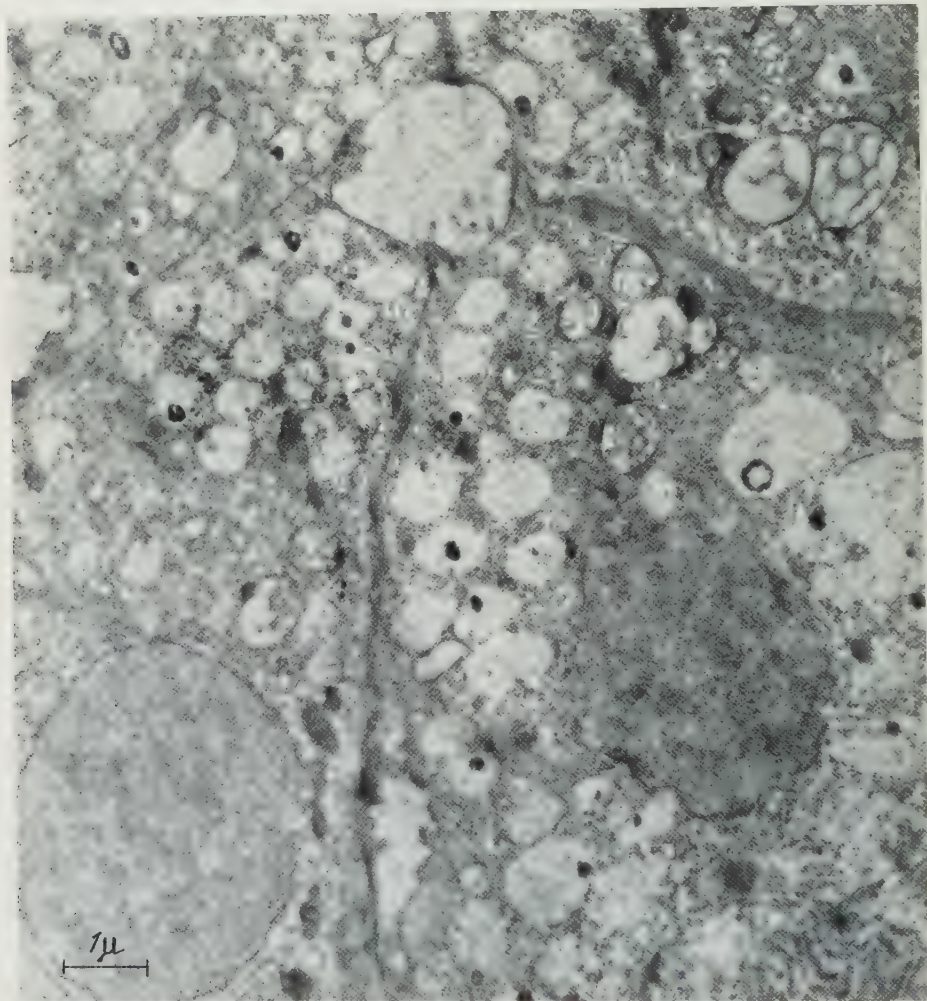


Abb. 4. Submandibularis, Mensch. Seröse Drüsenzellen eines Acinus. „Helle“ Prosekretvakuolen mit ringförmigen Innenkörperchen. Auffallend dichtes Hyaloplasma. Im oberen Bildabschnitt Acinuslumen, rechts oben gekammerte Prosekretvakuolen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 5000 \times .
Abbildung 15 000 \times (Arch.-Nr. 2982/60)

welche jeweils an den Kanten von drei aneinanderstoßenden Drüsenzellen lokalisiert sind, so daß jede Zelle mindestens drei Sekretkapillaren an ihrer Oberfläche aufweist (Abb. 1). Die Sekretkapillaren dringen vom Acinuslumen bis zur Hälfte oder noch weiter auf die Basalmembran vor. Sie sind allenthalben annähernd gleichweit und erweitern sich unmittelbar vor der Einmündung in das Acinuslumen trichterförmig. Die Weite der Sekretkapillaren dürfte funktionsabhängig sein; in manchen Acini sind die Kapillaren kollabiert, in anderen weit-

gestellt. Der mittlere Durchmesser der „geöffneten“ Sekretkapillaren beträgt $0,8-1\mu$. Charakteristisch sind zahlreiche, ins Lumen der Sekretkapillaren vorspringende Mikrovilli, deren Bedeutung vor allem in der Oberflächenvergröße-

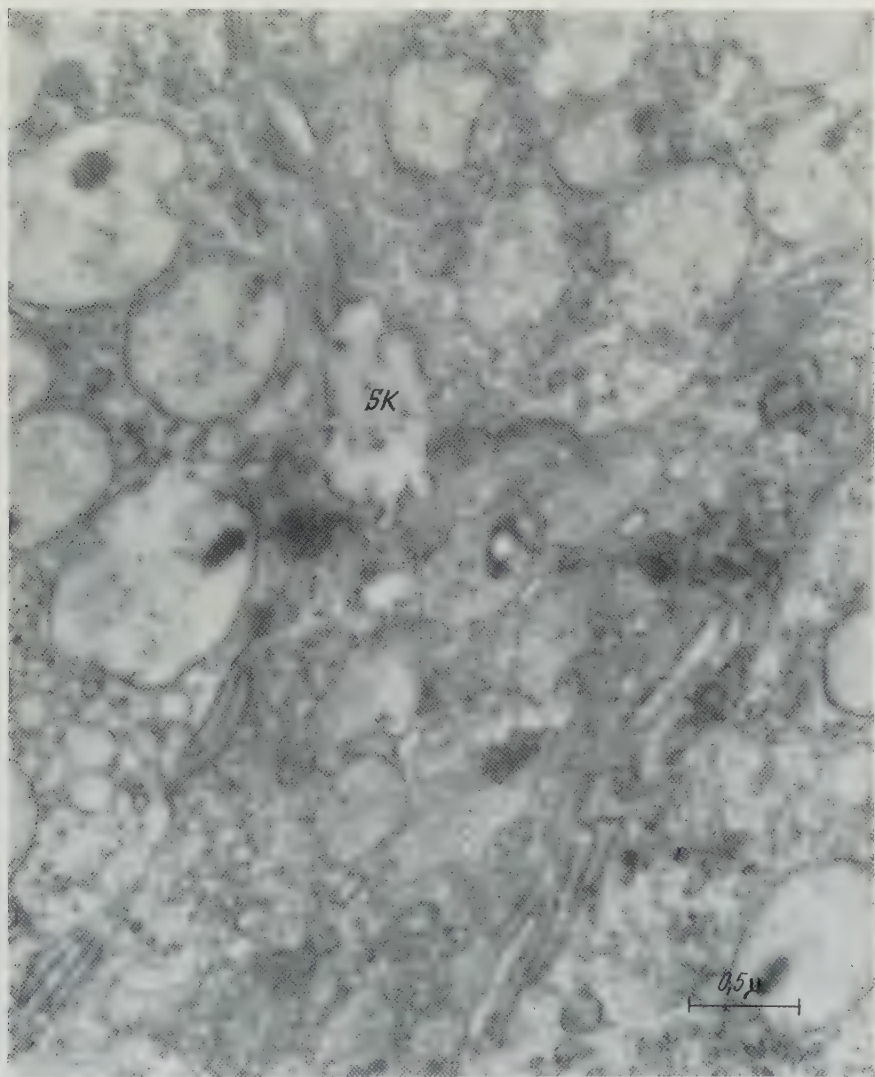


Abb. 5. Submandibularis, Mensch. Teile seröser Drüsenzellen mit interzellulärer Sekretkapillare. Im Querschnitt (Sk) „helle“ und „dunkle“ Prosekretvakuolen. Beachte die unterschiedliche Dichte des Hyaloplasmas. Elektronenmikroskopische Vergrößerung $11\,500\times$, Abbildung $28\,750\times$ (Arch.-Nr. 52/61)

rung zu sehen sein dürfte. Auch die apikale, unmittelbar an das Lumen der Acini angrenzende Zellmembran hat Mikrovilli, die jedoch spärlicher und plumper sind.

Zwischen den Acinuszellen mit der zwar wechselnden, jedoch grundsätzlich einheitlichen Struktur finden sich vereinzelte, komprimiert erscheinende, dichte

Zellelemente, welche den sog. Stiftzellen der Lichtmikroskopie entsprechen. Das Zytoplasma dieser schmalen Zellen ist homogen und dicht, der Kern länglich. Er hebt sich wegen der annähernd gleichen Dichte nur schwach von dem Zyto-

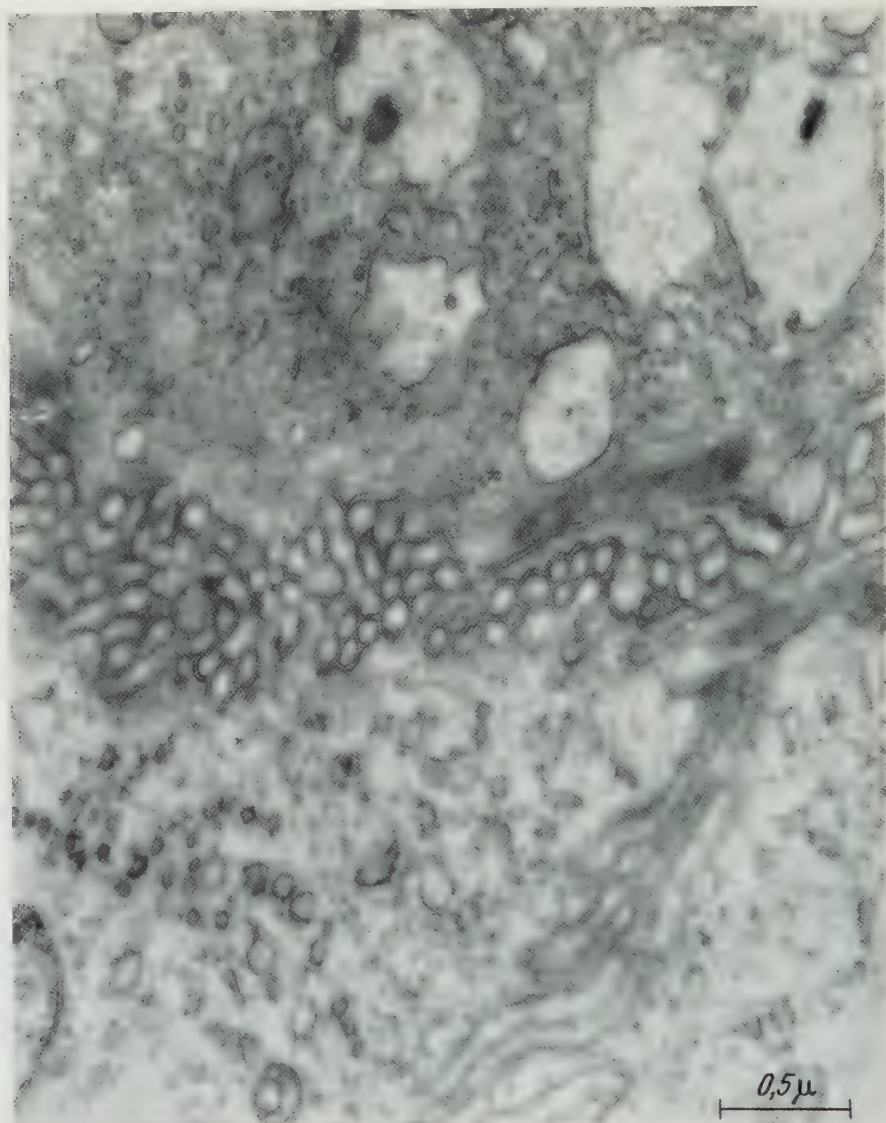


Abb. 6. Submandibularis, Mensch. Fingerförmige Verzahnung seröser Drüsenzellen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 15 000 \times , Abbildung 37 500 \times (Arch.-Nr. 49/61)

plasma ab. Die Verzahnung der Plasmamembranen fehlt teilweise bzw. ist stellenweise schwächer ausgeprägt. In diesem Verhalten könnte die Voraussetzung für die Ausstoßung der Stiftzellen aus dem Zellverband gesehen werden.

Bezüglich des Ergastoplasmas haben unsere Beobachtungen keine wesentlichen Abweichungen von den Befunden an Nagern erbracht. Abb. 8 zeigt den

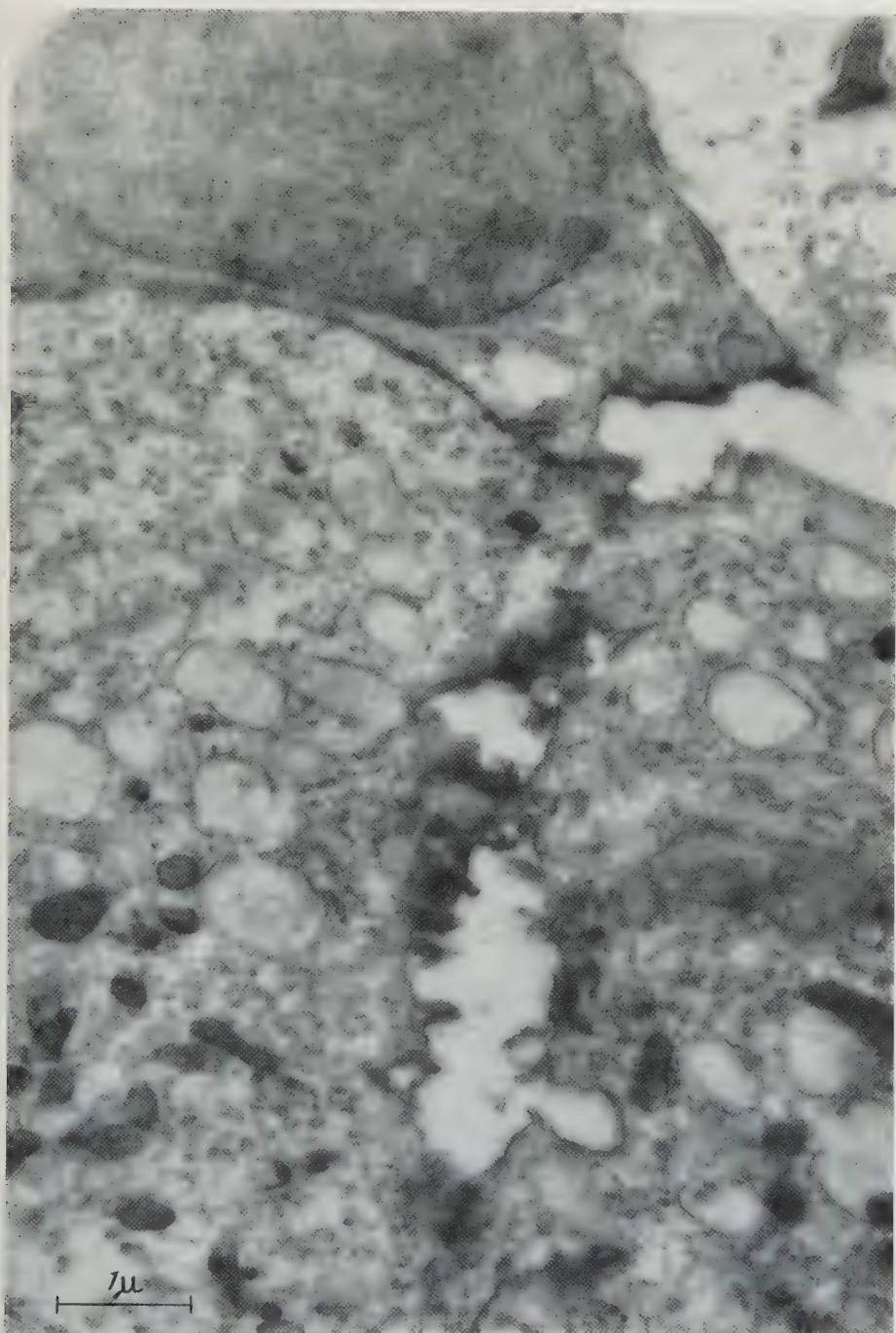


Abb. 7. Submandibularis, Mensch. Interzelluläre Sekretkapillaren mit Mikrovilli. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 6000 \times , Abbildung 18000 \times (Arch.-Nr. 3099/60)

basalen Teil einer serösen Drüsenzelle der Submandibularis. Die parallel verlaufenden Doppelmembranen des endoplasmatischen Retikulums hören vor der

Zellmembran auf. Das von den Doppelmembranen eingeschlossene Material ist sehr dicht, was auf eine sekretorische Leistung hinweisen könnte (BARGMANN

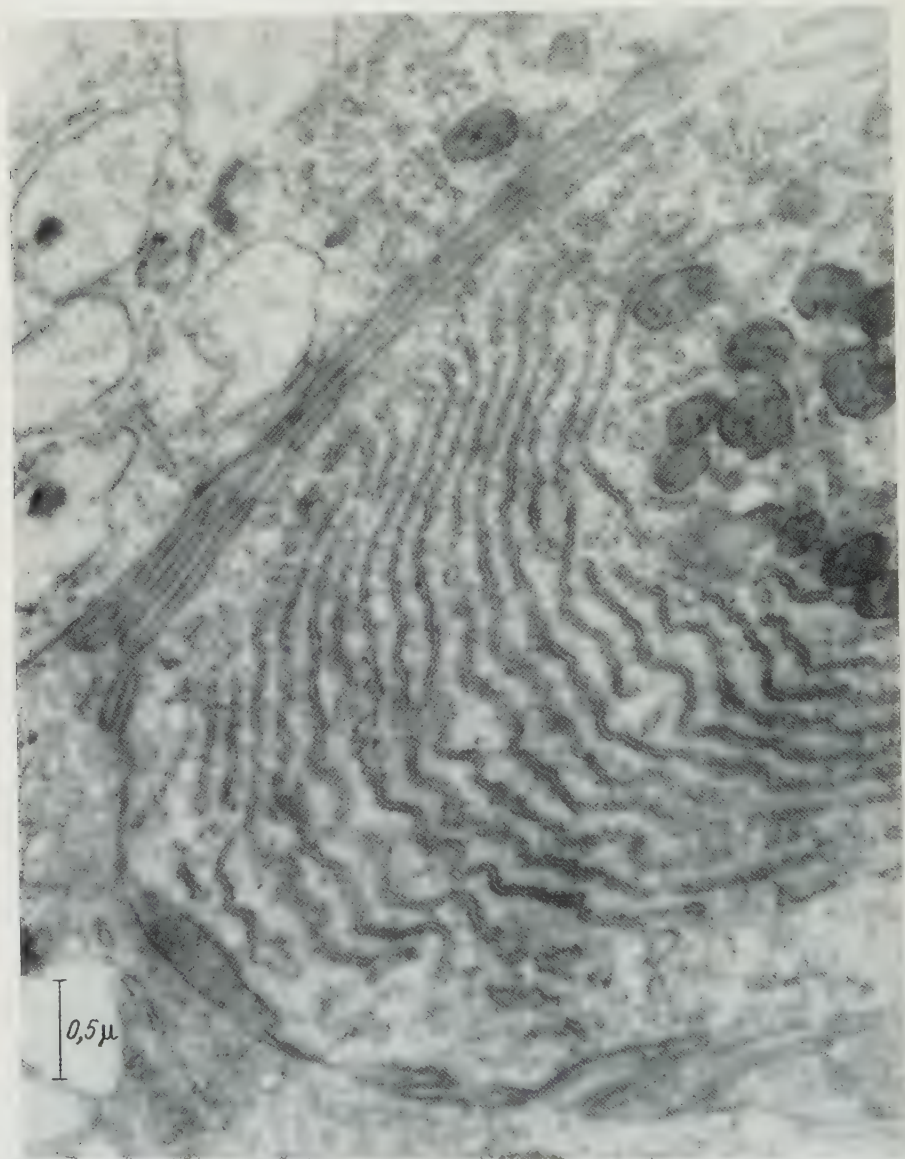


Abb. 8. Submandibularis, Mensch. Ergastoplasmalamellen mit RNS-Granula aus dem basalen Teil einer serösen Drüsenzelle. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 11500 \times , Abbildung 28750 \times (Arch.-Nr. 54/61)

1959). Zwischen der Menge der Doppelmembranen und Prosekretvakuolen besteht eine Beziehung: sind die Doppellamellen reichlich ausgebildet, so finden sich relativ wenig Prosekretvakuolen und umgekehrt.

2. Die mukösen Drüsenzellen der Submandibularis

Die mukösen Drüsenzellen zeichnen sich durch zwei lichtmikroskopisch wohl-bekannte, sehr unterschiedliche Regionen aus. Die basale Region, in der der abgeplattete Zellkern liegt, hat ein sehr dichtes Zytoplasma, während die voluminöse Region, die von den Sekretmassen erfüllt ist, hell erscheint (Abb. 9). Diese Sekretmassen sind allseitig von einer dünnen Schicht des dichten Zytoplasmas

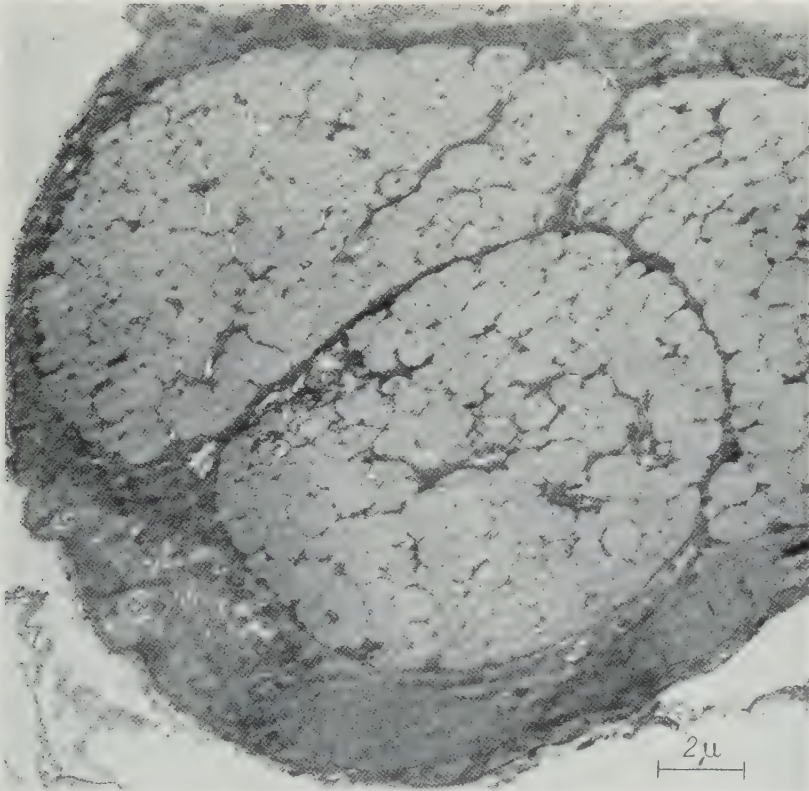
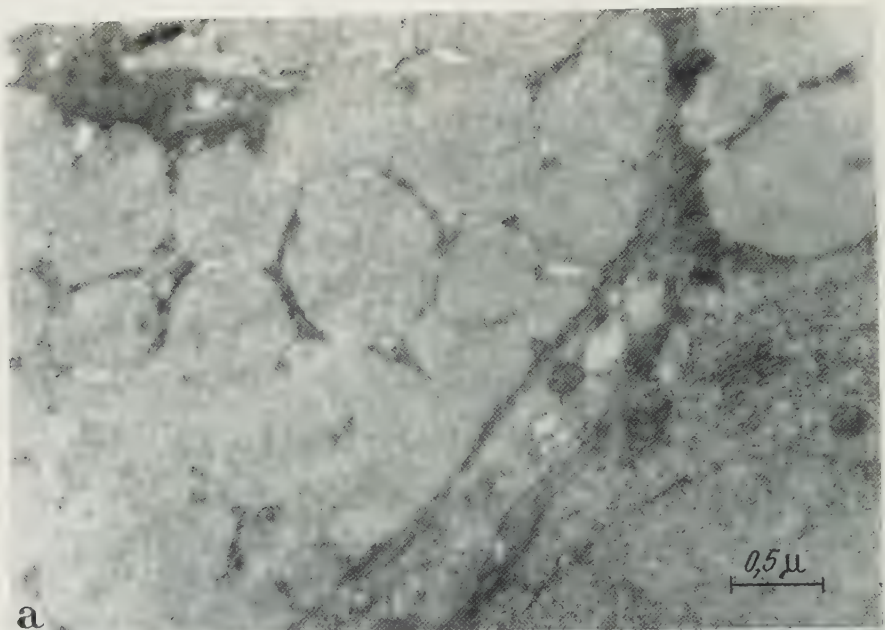
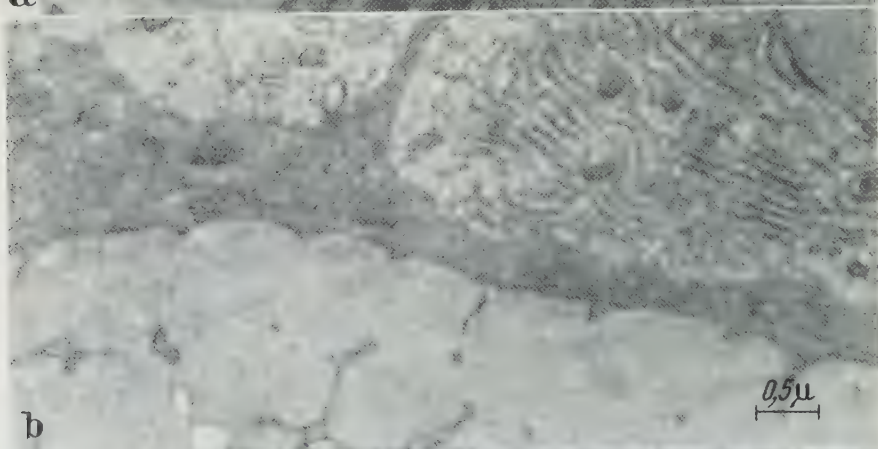


Abb. 9. Submandibularis, Mensch. Muköse Drüsenzellen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 6250 \times (Arch.-Nr. 3447/60)

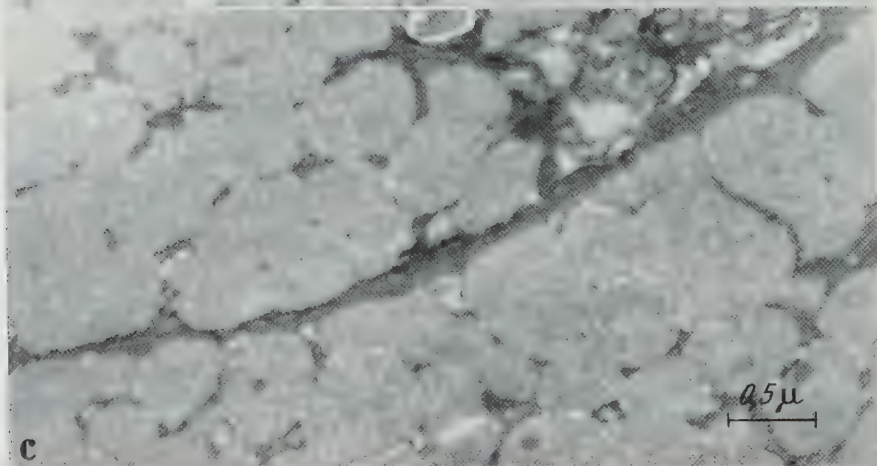
umgeben und auf diese Weise gegen die Nachbarzellen abgegrenzt. Sie bestehen aus verschiedenen großen Vakuolen, welche mit Teilen ihrer Oberfläche zusammengefloßen sind, an anderen Stellen ihrer Oberfläche aber durch dünne Stränge des zwischen den Vakuolen erhaltenen Zytoplasmas abgegrenzt sind. Auf diese Weise sind große Komplexe entstanden, die möglicherweise ein Kontinuum bilden (Abb. 9). Nur an einzelnen Stellen, vornehmlich im Zentrum der Sekretmassen, sind dickere Stränge von Zytoplasma erhalten. Der Inhalt der konfluerten Vakuolen besteht aus einer homogenen Substanz, in der kontrastarme feinste Netzstrukturen zu erkennen sind (Abb. 10). Einzelne Sekretvakuolen enthalten Innenkörper, die jedoch von geringerer Dichte sind als die Innenkörper in den Prosekretvakuolen der serösen Drüsenzellen. Die basale Zellregion mit



a



b



c

Abb. 10 a — c. Submandibularis, Mensch. Ausschnitte aus mukösen Drüsenzellen mit strangförmigen Zytoplasmaresten. Vergrößerung a 30 000 ×, b 20 000 ×, c 20 000 × (Arch.-Nr. 3454—56/60)

dem abgeplatteten Zellkern besteht aus einem sehr dichten Hyaloplasma mit undeutlich erkennbaren Doppelmembranen, Bläschen und Mitochondrien. Auch die zentralen strangartigen Zytoplasmareste lassen Strukturen des endoplasmatischen Retikulums erkennen (Abb. 10).



Abb. 11. Submandibularis, Mensch. Interacinäre Retikulumzelle mit sackartig erweiterten Hohlräumen der Zytomembranen und kontrastarmen, geschwollenen Mitochondrien. Sehr kontrastarmes Hyaloplasma. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 8000 \times , Abbildung 20 000 \times (Arch.-Nr. 39/61)

An geeigneten Stellen kann man feststellen, daß auch die mäanderartig gewellten Zellmembranen benachbarter muköser Zellen tief miteinander verfalzt sind.

3. Das Bindegewebe zwischen den Acini

Das Bindegewebe zwischen den Acini und in der Umgebung der Gänge besteht aus Fibrozyten und Fasern, Retikulumzellen und Wanderzellen, Gefäßen und Bündeln markarmer Nervenfasern. Die Fibrocyten mit langen, schmalen Ausläufern zeigen das gewohnte Bild. In ihrer Umgebung sind Bündel feiner Kollagenfibrillen und vereinzelte elastische Fasern zu beobachten. Eine retikuläre Bindegewebszelle, deren endoplasmatisches Retikulum vakuolär erweitert ist, zeigt Abb. 11. Form und Ausdehnung dieser Zysternen variieren schon innerhalb

einer Zelle erheblich. Die Mitochondrien in groß-vakuolären Retikulumzellen sind meist hell und geschwollen. Außerdem sind im lockeren Bindegewebe Bündel markarmer Nervenfasern unregelmäßig verteilt. Die sehr dünnen Axone werden allseitig von Hüllzellen umgeben. Die äußere gemeinsame Hülle besteht

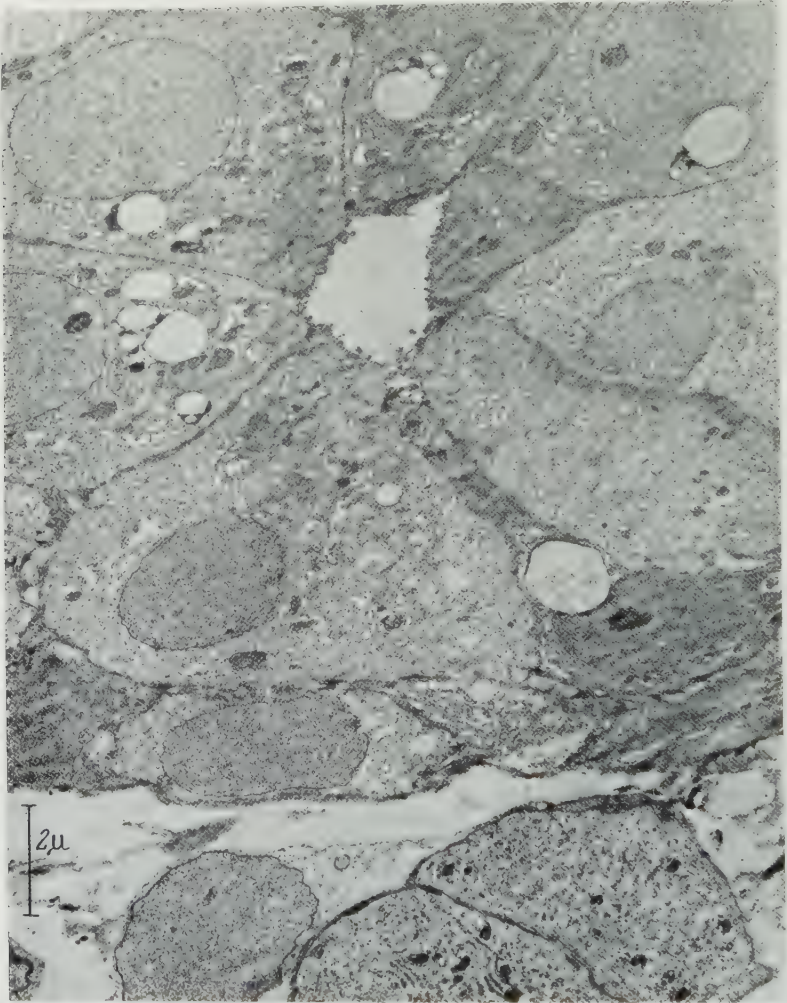


Abb. 12. Submandibularis, Mensch. Querschnitt eines Isthmus. Beachte große, optisch leere supra-nukleär und paranukleär gelegene Vakuolen und kleinere dichte Vakuolen im apikalen Zellteil. Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 5000 \times (Arch.-Nr. 3446/60)

aus einem dichten Geflecht von Kollagenfibrillen. Einzelne, von Hüllzellen freie Axone konnten nicht beobachtet werden; auch fanden wir im Gegensatz zu PEASE und SCOTT keine Axone in oder zwischen Epithelzellen. Die Verwechslung von Fortsätzen von Wanderzellen mit angeblich hüllfreien Axonen ist sehr leicht möglich (vgl. hierzu S. 176).

4. Die Abschnitte des Gangbaumes

Die Histophysiologie der großen Speicheldrüsen hat eine Reihe von Hinweisen dafür erbracht, daß die lichtmikroskopisch wohl definierten Abschnitte

des Gangbaumes der großen serösen Mundspeicheldrüsen (Schaltstücke, Sekretrohre, interlobuläre Gänge) das von den Endstücken produzierte eiweißhaltige Sekret, den Primärspeichel, in spezifischer Weise verändern und in den in die Mundhöhle sich ergießenden Sekundärspeichel verwandeln.

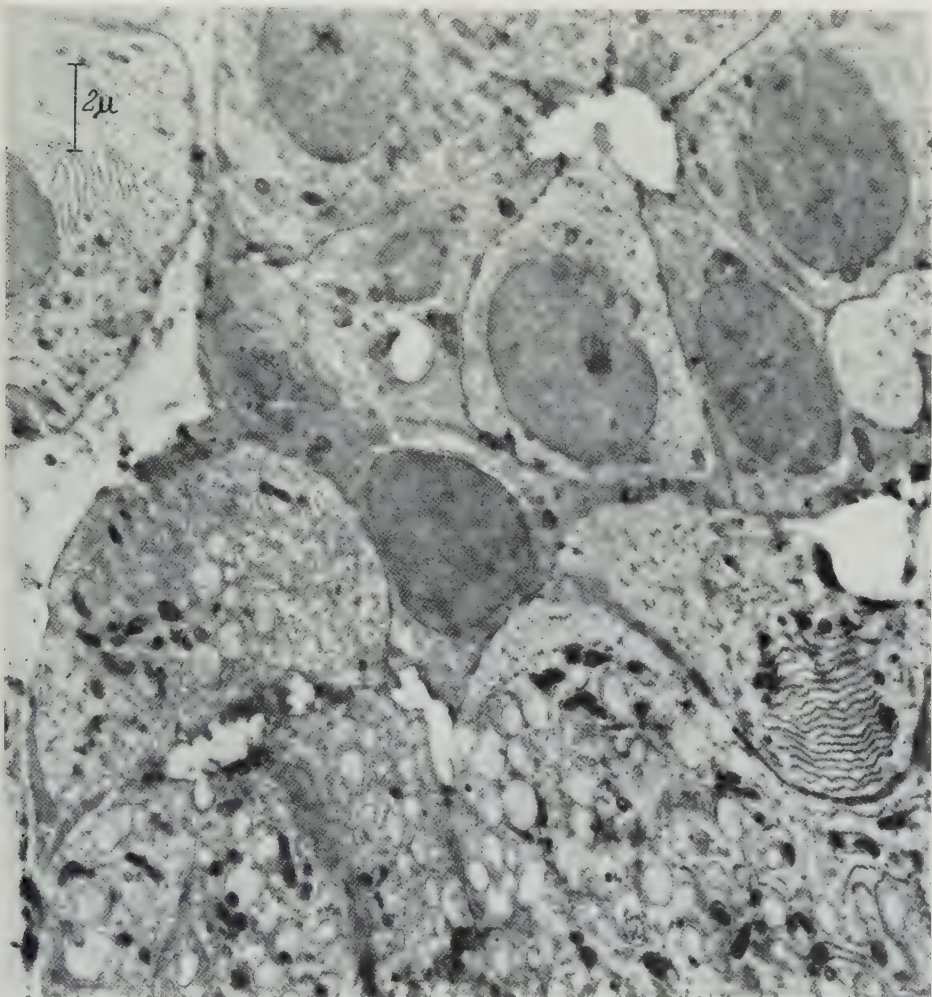


Abb. 13. Submandibularis, Mensch. Oben Querschnitt eines Isthmus. Die Epithelzellen mit teilweise supranukleär und apikal gelegenen, dicht gepackten Vakuolen. Unten seröse Drüsenzellen mit einer dichten „Stütz zelle“. Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 7500 \times (Arch.-Nr. 3098/60)

a) **Die Schaltstücke.** Die Ausbeute der Lichtmikroskopie an den Zellen der Schaltstücke ist recht spärlich. Elektronenmikroskopisch kann man zwei Abschnitte der Schaltstücke unterscheiden, nämlich einen proximalen mit plattem bis niedrig kubischem Epithel und einen distalen mit kubischem bis niedrig prismatischem Epithel. Der Übergang zwischen beiden Abschnitten ist kontinuierlich.

Ein elektronenmikroskopisches Bild der Schaltstückzellen im distalen Abschnitt (Abb. 12) läßt folgendes erkennen: Die niedrig prismatischen Zellen haben einen kugeligen oder eiförmigen Kern, der näher der Basis als dem Lumen liegt. Die seitlichen Zellmembranen grenzen meist glatt aneinander; nur gelegentlich

haben sie S-förmige Faltungen, besonders in Lumennähe. Die Epithelzellen bieten einen recht unterschiedlichen Aspekt. Die Mehrzahl besitzt ein dichtes Zytoplasma und zahlreiche Mitochondrien, welche nicht selten in auffallender Weise in den supranukleären und apikalen Regionen massiert sind, oft sogar unmittelbar unter der Oberfläche zum Lumen liegen und hier in der Längsrichtung der gestreckten Zelle orientiert sind. In benachbarten Zellen wiederum sind die Mitochondrien spärlich; hier ist die apikale Region von dicht gedrängten Sekretvakuolen mit dichtem homogenem Inhalt erfüllt (Abb. 14). Außerdem finden sich große helle Vakuolen, die paranukleär und — unmittelbar der Kernmembran anliegend — supranukleär liegen; einzelne oder mehrere Vakuolen erreichen teilweise Kerngröße (Abb. 12). In den Schaltstückzellen mit an der Oberfläche massierten Mitochondrien fehlen die hellen Vakuolen bzw. sie sind klein und spärlich. Die größeren der hellen Makrovakuolen sind von einer dicken Membran umgeben; ihr Inhalt ist teilweise plurivakuolär.

Die Golgi-Substanz ist relativ spärlich, orientierte Doppellamellen fehlen. Vereinzelt finden sich ganz helle Schaltstückzellen mit Sekretvakuolen (Abb. 13). Die apikale Oberfläche der Schaltstückzellen ist von spärlichen Mikrovilli besetzt, das Lumen gelegentlich von einem locker körnigen Inhalt erfüllt.

Auf Grund dieser Beobachtungen kann kein Zweifel darüber bestehen, daß die Schaltstückzellen in erheblichem Umfange sekretorisch tätig sind, d. h. dem Primärspeichel Produkte begeben. Weiter ist die Massierung der Mitochondrien in den initialen Teilen der Schaltstücke unmittelbar unter der Oberfläche zum Lumen bemerkenswert; sie läßt an eine mittelbare oder unmittelbare Einwirkung auf das Sekret denken.

b) Die Sekretrohre. Die prismatischen Epithelzellen der Sekretrohre (Streifenstücke) sind durch Besonderheiten ausgezeichnet (Abb. 15, 16, 17):

1. Die Zellkerne liegen näher dem Lumen als der Basis.
2. Die Zellen selbst sind dicht von Mitochondrien erfüllt, welche in Säulen angeordnet die breite Zone zwischen Basalmembran und Zellkern einnehmen, den Kern schalenartig umgeben und den apikalen Zellteil teilweise bis unmittelbar unter die Oberfläche besetzen.
3. Die basale Zellmembran ist tief und jeweils mehrfach eingefaltet. Die Falten erstrecken sich bis in Kernnähe und fassen die sich kernwärts fortsetzenden Mitochondriensäulen zwischen sich.

Die seitlichen Zellmembranen liegen nicht glatt aufeinander, sondern sind mit kurzen spitzwinkeligen Zacken ineinander verzahnt, während gegen das Lumen kurze fingerförmige Fortsätze vorgestülpt sind.

In den durch die Einstülpungen der basalen Zellmembran entstandenen Kompartimenten sind die Mitochondrien in der Längsachse der Zelle orientiert. Die eingestülpten Zellmembranen dringen nahezu bis zur Hälfte der Zellhöhe vor, erreichen jedoch niemals die basale Oberfläche des Zellkernes. Nebeneinander können jeweils 2—12 durch die Einfaltung entstandene Blätter gezählt werden (Abb. 16).

Die Mitochondriensäulen sind zweifellos das Substrat der „Basalstreifung“ der Sekretrohre in der Lichtmikroskopie, wodurch die Analogie zu den Epithelien der proximalen Abschnitte der Nierenkanälchen unterstrichen wird. Die Ein-

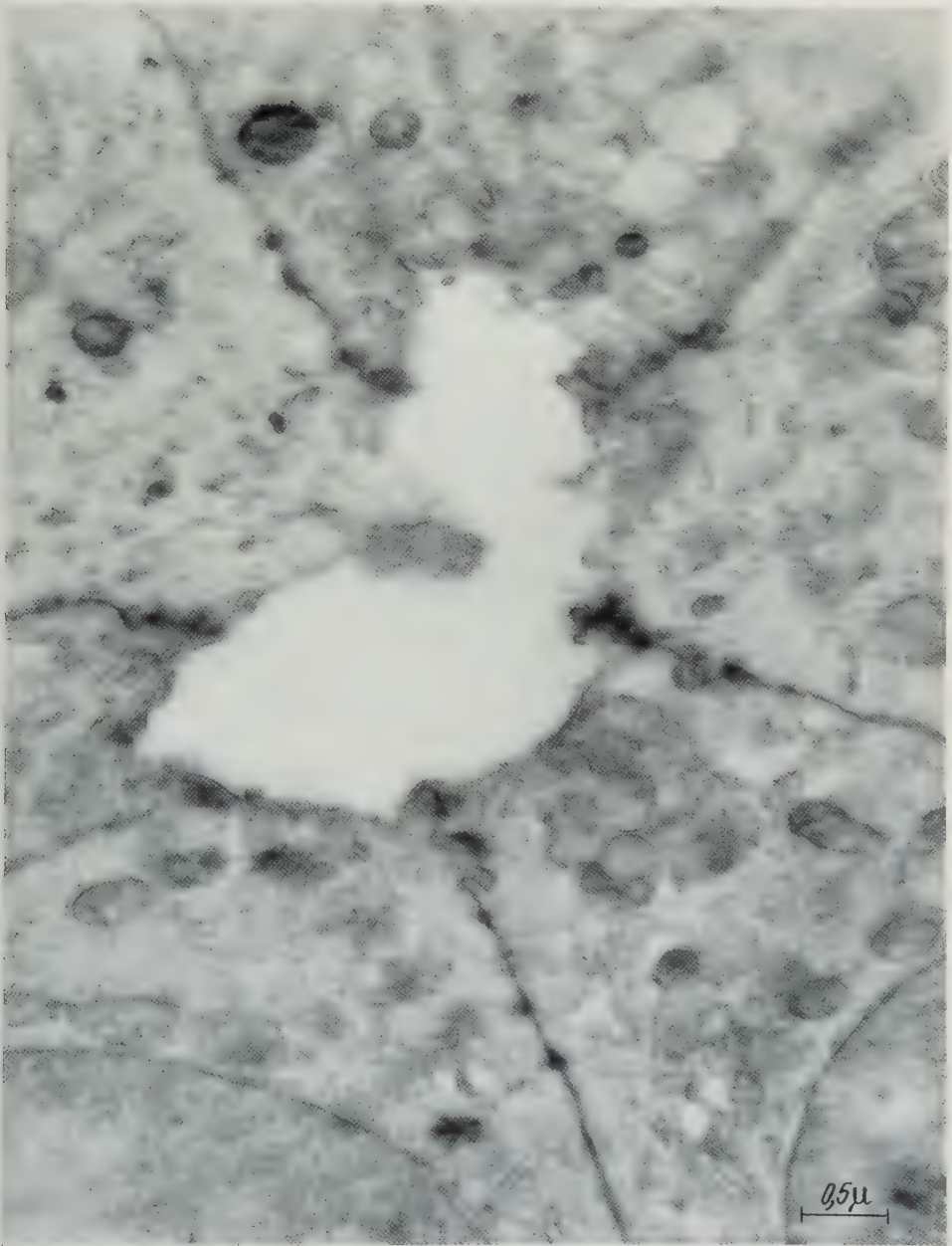


Abb. 14. Submandibularis, Mensch, Isthmus. Lumennahe Teile der Epithelzellen (stärkere Vergrößerung der Abb. 14). Unterschiedlich große und dichte Vakuolen, von einer distinkten Membran begrenzt, im apikalen Zellteil. Rechts unten eine supranukleär gelegene Golgi-Zone. Zellmembran glatt oder mäßig gefaltet. Beachte die spärlichen und kurzen Mikrovilli. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 10 000 \times , Abbildung 30 000 \times (Arch.-Nr. 3103/60)

faltungen der basalen Zellmembran bedeuten eine ganz erhebliche Vergrößerung der basalen Oberfläche der Zellen.

Das zwischen den Mitochondrien verbleibende Hyaloplasma ist relativ strukturarm, orientierte Doppellamellen fehlen. Ebenso sind nur wenige Golgi-Strukturen aufzufinden.



Abb. 15. Submandibularis, Mensch. Querschnitt eines Streifenstückes. Lumennahe Lage der Zellkerne. Mitochondriensäulen in der basalen Zellhälfte. Mitochondrienhäufung in der supranukleären Region. Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 5000 \times (Arch.-Nr. 3445/60)

Vereinzelte elektronenoptisch leere Vakuolen sind besonders in supranukleärer, seltener in infranukleärer Lage anzutreffen. Sie lassen eine sekretorische Leistung auch der Streifenstücke als wahrscheinlich annehmen.

Ein Teil der Epithelzellen der Sekretrohre besitzt ein oder mehrere sehr große plurivakuoläre Gebilde in charakteristischer supranukleärer Lage im Bereich der Golgi-Zone. Die multivesikulären Vakuolen bedingen nicht selten

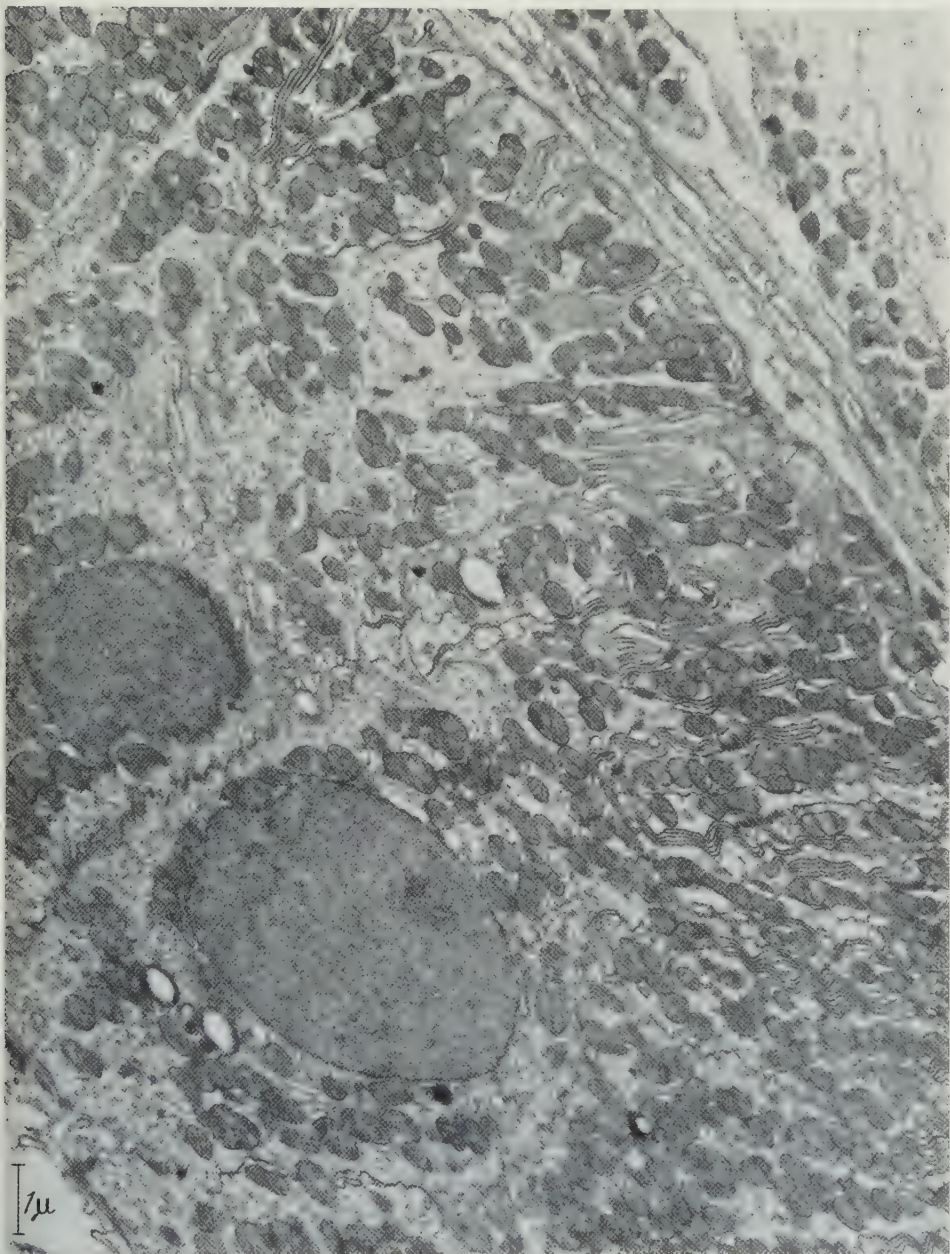


Abb. 16. Submandibularis, Mensch. Wand eines Streifenstückes. Der basale Teil der Zellen ist durch zahlreiche, bis in Kernnähe reichende Einfaltungen in Kompartimente unterteilt; zwischen diesen die Mitochondrien. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 15000 \times (Arch.-Nr. 3445/60)

eine Eindellung des Zellkerns, finden jedoch nie einen unmittelbaren Kontakt mit der Kernmembran selbst, sie sind vielmehr immer durch eine, wenn auch oft äußerst schmale Zytoplasmazone von ihr getrennt (Abb. 18). Der Durchmesser der gekammerten Riesenvakuolen kann den des Zellkerns erreichen. Wenn

zwei oder mehrere dieser Vakuolen in einer Zelle vorhanden sind, haben sie offensichtlich die Tendenz, zu konfluieren, da Achterfiguren bzw. sanduhrartige Gebilde nicht selten sind. Die gekammerten Riesenvakuolen entstehen im Golgi-

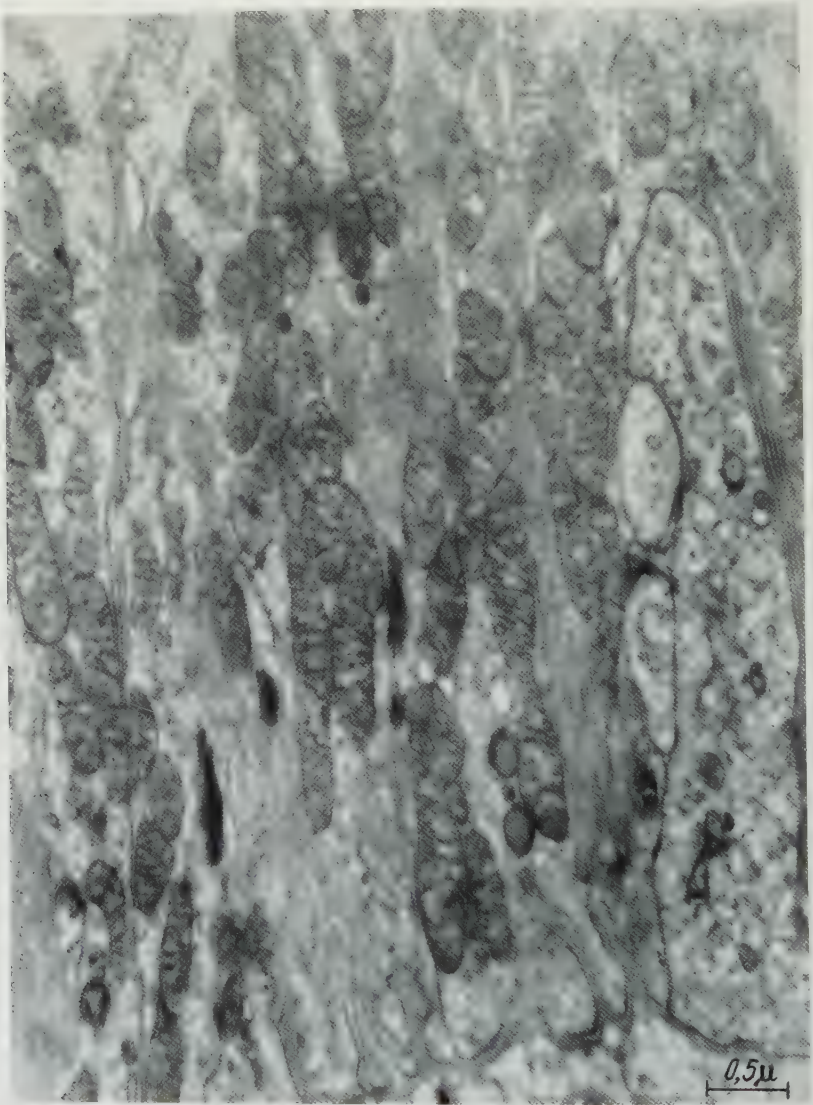


Abb. 17. Submandibularis, Mensch. Ausschnitt aus dem basalen Teil einer Streifenstückzelle. Die stäbchenförmigen Mitochondrien dicht gepackt zwischen den von der Basis ausgehenden Einfaltungen, die stellenweise parallel geschichtet sind. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 10 000 \times , Abbildung 20 000 \times (Arch.-Nr. 3443/60)

Feld, in welchem zunächst einzelne, kleinere Vakuolen sichtbar werden, die sich vergrößern und das Golgi-Material „verbrauchen“ bzw. an den Rand verdrängen. Diese kleinen Vakuolen sind von einem homogenen, dichteren Inhalt erfüllt, während die größeren optisch leer erscheinen und teilweise konfluieren. Mito-

chondrien liegen schalenartig um den Komplex, wobei einzelne in unmittelbaren Kontakt mit der Vakuolenoberfläche treten (Abb. 19).

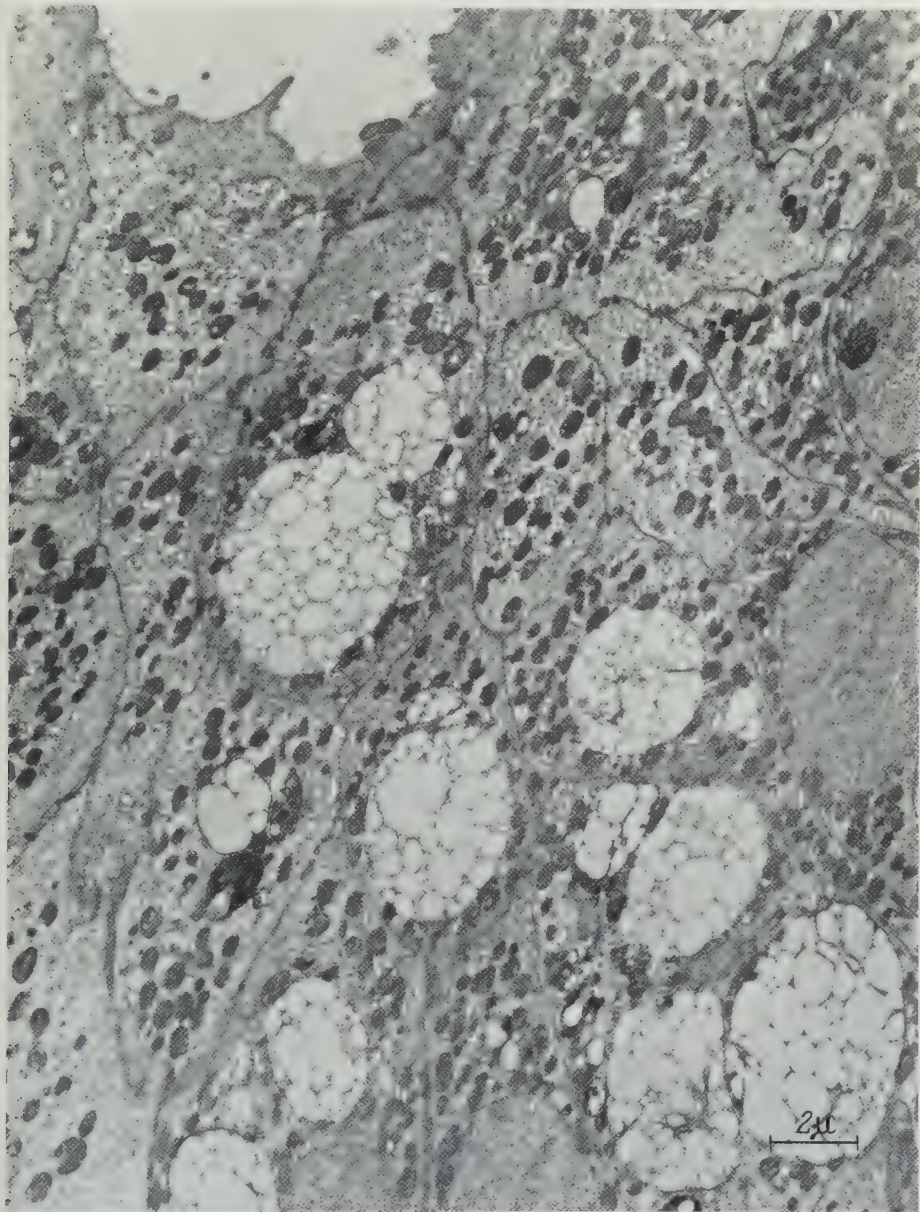


Abb. 18. Submandibularis, Mensch. Schrägschnitt durch die apikalen Zellteile eines Streifenstückes. Neben zahlreichen Mitochondrien große plurivesikuläre Vakuolen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 7500 \times (Arch.-Nr. 2977/60)

Einer besonderen Erwähnung bedürfen Zellen im Epithelverband der Sekretrohre, welche die charakteristischen Merkmale der differenzierten Epithelzellen, wie den Mitochondrienreichtum und die mehrfachen Einfaltungen der basalen

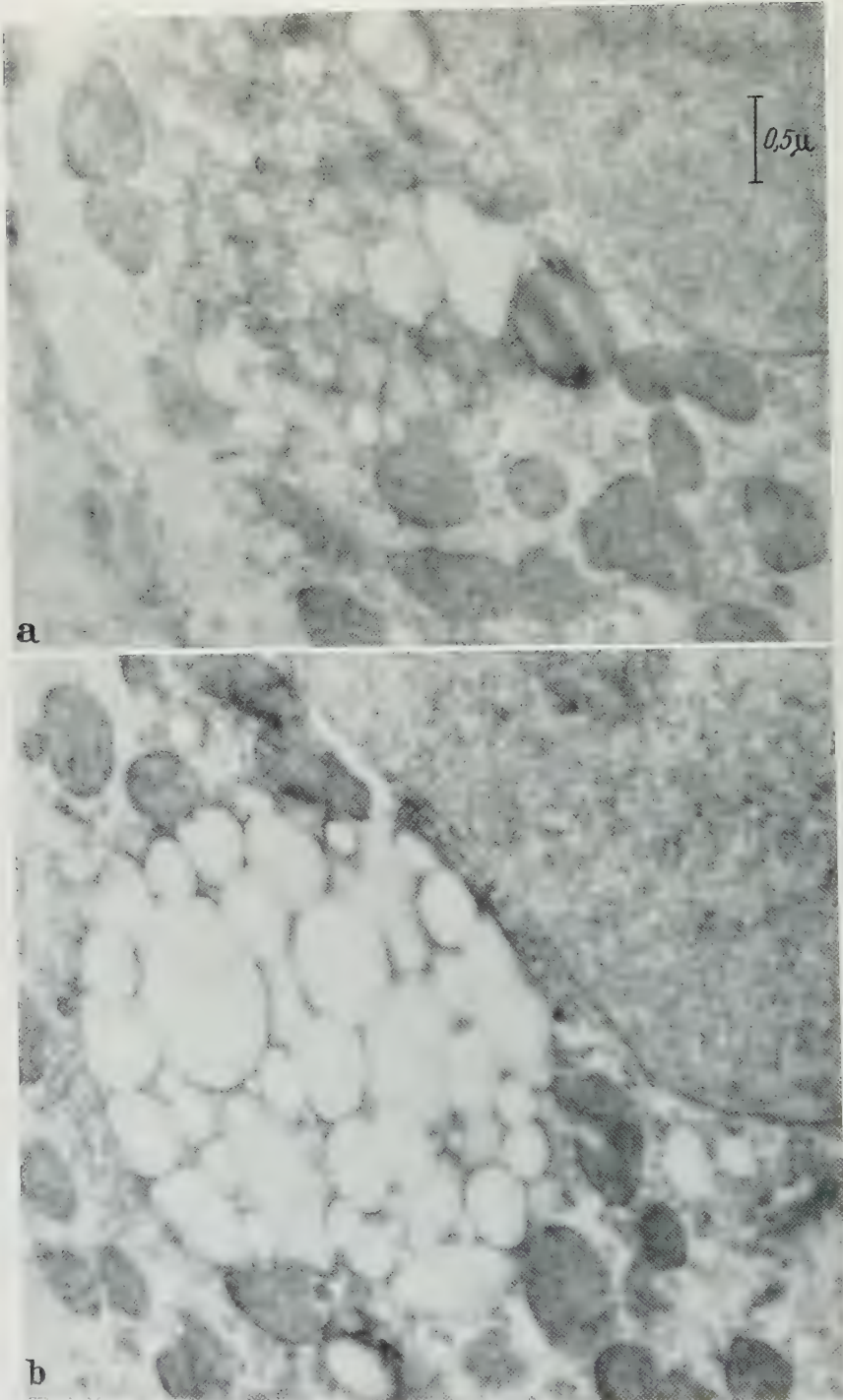


Abb. 19 a u. b. Submandibularis, Mensch. Streifenstückzellen. a Supranukleäre Golgi-Zone mit beginnender Vakuolenbildung. Der Golgi-Komplex wird von zahlreichen Mitochondrien begrenzt. b Multivesikuläre Vakuole, ebenfalls supranukleär gelegen und von Mitochondrien umgeben. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 10 000 \times , Abbildung 25 000 \times (Arch.-Nr. 61/60, 62/60)

Plasmamembran, vermissen lassen und im ganzen einen undifferenzierten Eindruck machen. Ihr Hyaloplasma ist heller als das der übrigen Epithelzellen. Sie besitzen nur vereinzelte Mitochondrien und kleine Bläschen. Sie sitzen der Basalmembran auf und erreichen das Lumen nicht, weswegen wir sie als Basalzellen oder Ersatzzellen kennzeichnen und annehmen, daß durch ihre Teilung die Regeneration der Epithelzellen erfolgt. Die Abb. 20 (a und b) zeigt eine derartige helle Basalzelle mit sanduhrartig eingeschnürtem Zelleib und entsprechendem hantelförmigem Zellkern. Die Zellmembran ist in ihrem ganzen Umfang glatt und faltenlos.

IV. Erörterung der Befunde

Die schon lichtmikroskopisch beschriebenen Unterschiede der Speicheldrüsen werden elektronenmikroskopisch bestätigt und ergänzt. So konnten in dem von uns untersuchten Material keine dichten, osmiophilen Sekretgranula beobachtet werden, wie sie SCOTT und PEASE für die Ratte beschrieben haben. Die Prosekretvakuolen der menschlichen Speicheldrüsen unterscheiden sich von denen der Nagetiere durch größere Variationen der Form und Struktur. Die Vakuolen sind meist nicht gleichmäßig rund oder oval gestaltet, ihre Oberfläche bzw. die Vakuolenmembran ist gelegentlich unregelmäßig gefältelt. Die osmiophilen Innenkörper wurden bei den Nagetieren offenbar vermißt. Auch die kleinen, kontrastarmen Körnchen der Prosekretvakuolen scheinen eine Besonderheit der menschlichen Speicheldrüsen zu sein. Besondere Beachtung verdienen die unterschiedlichen Dichteverhältnisse sowohl des Vakuoleninhalts als auch des umgebenden Hyaloplasmas. So gibt es struktur- und kontrastarme Prosekretvakuolen, die in ein sehr dichtes, kontrastreiches Hyaloplasma eingebettet sind (Abb. 4), daneben Zellen, in denen sowohl Prosekretvakuolen als auch Hyaloplasma hell und kontrastgleich erscheinen (Abb. 7). Schließlich sind seröse Acinuszellen zu erwähnen, in denen sowohl Vakuoleninhalt als auch Hyaloplasma kontrastreicher sind. Diese Befunde könnten darauf hinweisen, daß Viskositätsänderungen des Hyaloplasmas und der Prosekretvakuolen bei der Sekretbildung und -abgabe eine Rolle spielen.

Die Annahme der meisten Autoren, daß die Prosekretvakuolen aus den Lamellen des Ergastoplasmas gebildet werden, kann durch unsere Befunde insofern gestützt werden, als gut erkennbare, parallel orientierte Ergastoplasma-lamellen nur in Drüsenzellen mit wenig Prosekretvakuolen vorkommen und umgekehrt.

Die in unmittelbarer Umgebung der Prosekretvakuolen in großen Mengen vorhandenen Röhrcchen und Bläschen, die nicht nur in Kernnähe, sondern auch in allen übrigen Zellbereichen gleich häufig vorkommen, dürften nicht als Strukturen des Golgi-Komplexes anzusprechen sein. Möglicherweise handelt es sich hier um Übergangsformen zwischen Ergastoplasma-lamellen und Prosekretvakuolen.

Bezüglich des Abgabemechanismus des Prosekrets aus den Acinuszellen neigen wir zu der Hypothese, daß die meisten Prosekretvakuolen ihren Inhalt zunächst in das Hyaloplasma abgeben und daß das Prosekret von hier aus in die interzellulären Sekretkapillaren bzw. das Acinuslumen gelangt. Sollte die Abgabe des Vakuoleninhalts nur durch Eröffnung der Vakuolen in das Lumen bzw. die Sekretkapillaren erfolgen, so müßten solche Bilder häufiger zu beobachten sein.

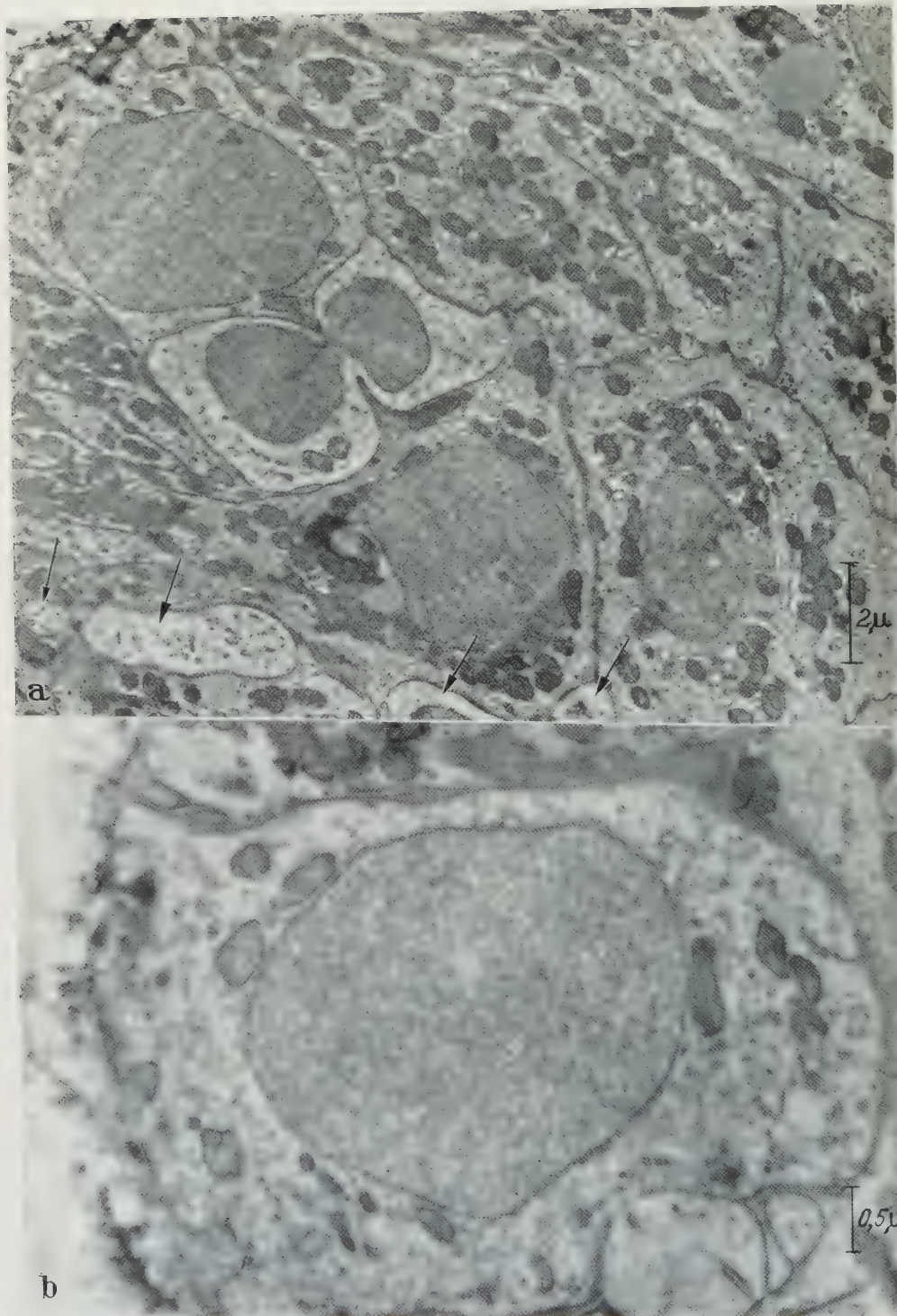


Abb. 20. a Hantelförmige helle Zelle zwischen Epithelzellen eines Streifenstückes. Beachte die Einschnürung des Zellkernes (Amitose?). Die Pfeile weisen auf Ausschnitte ähnlicher heller Zellen. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 7500 \times (Arch.-Nr. 58/61). b Basalzelle im Epithel eines Sekretrohres. Beachte die Wellung der Zellbasis, der eine relativ breite homogene Basalmembran und zahlreiche Kollagenfibrillen angelagert sind. Das Hyaloplasma ist hell und strukturarmer. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 10000 \times , Abbildung 20000 \times (Arch.-Nr. 59/61)

Die interzellulären Sekretkapillaren lassen eine charakteristische Topik erkennen. Sie finden sich jeweils nur an den Kanten der pyramidenförmigen Drüsenzellen, wo in der Regel drei Zellen aneinandergrenzen, d. h. jede interzelluläre Sekretkapillare wird von den Zellmembranen dreier Zellen gebildet.

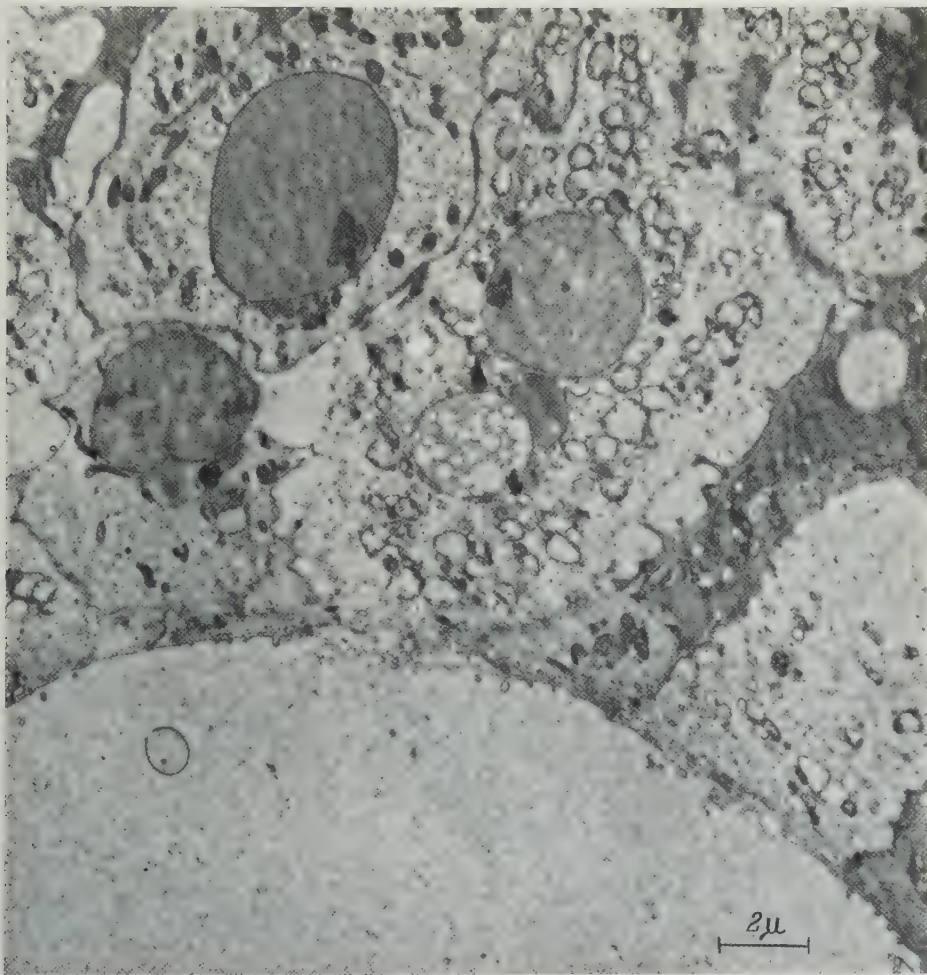


Abb. 21. Submandibularis, Mensch, Ausführungsgang. Im mehrschichtigen Epithel eine sehr dichte Stützelle. Im mittleren Bildteil eine supranukleär gelegene multivesikuläre Vakuole. Im hellen Zytoplasma helle geschwollene Mitochondrien, im Lumen feinste Körnchen und Netze. Elektronenmikroskopische Vergrößerung 2500 \times , Abbildung 7500 \times (Arch.-Nr. 2970/60)

(Abb. 1, Pfeile). Interzelluläre Sekretkapillaren werden nie an den Flächen der Drüsenzellen gefunden.

Die in der Lichtmikroskopie übliche Unterscheidung von sezernierenden Teilen (Acini) und Gangbaum in den großen Speicheldrüsen entspricht nicht den elektronenmikroskopischen Befunden. Es ergibt sich nämlich, daß die Epithelien *aller Abschnitte* des Gangbaumes in erheblichem Maße sekretorisch tätig sind, d. h. aktiv an der Bereitung des Sekundärspiegels teilnehmen. In dieser Sicht weist die Organisation des Gangbaumes seröser Drüsen eine nicht zu übersehende

Analogie zur Differenzierung der Nierenkanälchen auf. Es liegt nahe, die Sekretrohre mit den proximalen Abschnitten des Hauptstückes zu vergleichen. Als Strukturmerkmal ist beiden die basale Streifenzeichnung gemeinsam, die auf den blattartigen Einfaltungen der basalen Zellmembran und den dazwischen säulenförmig angeordneten Mitochondrien beruht. Der Flüssigkeitstransport

spielt in beiden Systemen eine funktionelle Rolle. Ähnliche Beziehungen zwischen Struktur und Funktion hat PEASE darüber hinaus in den Zellen des Ziliarepithels, des Plexus chorioideus und der Stria vascularis des Innenohres gefunden. Die Schaltstücke wären dem dünnen Teil der Henleschen Schleife vergleichbar. Da die Sekretvakuolen in Schalt- und Streifenstücken nur para- und supranukleär vorkommen und eine enge Beziehung zum Golgi-Apparat erkennen lassen, ist eine funktionelle Beteiligung des Golgi-Apparates an der Entstehung dieser Sekretvakuolen wahrscheinlich.

Die Befunde über die Innervation der Speicheldrüsen sprechen ähnlich wie die an der Haut und der glatten Muskulatur gewonnenen (GANSLER 1958, 1961) für eine indirekte Erregungsübertragung.

Abb. 22. Schema einer serösen Drüsenzelle mit den interzellulären Sekretkapillaren an den Kanten der fünf- oder sechseckigen pyramidenförmigen Zellen

Bezüglich der Endigungsweise der Axone in der Nähe der Drüsenzellen ist die Deutung der Befunde nicht einheitlich. So beschreibt z. B. PEASE, daß Nervenendigungen tief in die interzellulären Sekretkapillaren zwischen benachbarten serösen Drüsenzellen oder zwischen Basalmembran und Drüsenzellen eindringen. In Übereinstimmung mit SCOTT und PEASE finden wir von Hüllzellen umgebene Axone im interacinären Bindegewebe, können jedoch das Eindringen von hüllzellfreien Axonen unter die Basalmembran von Drüsenzellen nicht beobachten.

Gelegentlich finden sich zwar runde oder längliche Zytoplasma-Anschnitte zwischen Drüsenzellen, die als Axonanschnitte gedeutet werden könnten. Wir

neigen jedoch zu der Auffassung, daß es sich hierbei um Anschnitte von Ersatzzellen oder Wanderzellen handelt, wofür unter anderem Abb. 20 zu sprechen scheint. Auch für die von SCOTT und PEASE als Axone gedeuteten Strukturen können ähnliche Erwägungen geltend gemacht werden.

Zusammenfassung

1. Die charakteristischen Zytoplasmastrukturen der serösen Drüsenzellen in der Submandibularis und Parotis des Menschen sind das endoplasmatische Retikulum zum Teil in Gestalt von Doppellamellen, die Mitochondrien, die Golgi-Zonen und die Prosekretvakuolen mit oder ohne distinkte Membran und einem charakteristischen, sehr dichten Innenkörperchen. Der Inhalt der Prosekretvakuolen in den verschiedenen Drüsenzellen ist von wechselnder Dichte.

An den Seitenflächen der serösen Drüsenzellen sind die Zellmembranen blattartig tief miteinander verfalzt. Auch kommen fingerförmige Verzahnungen vor; sie dienen dem Zusammenhalt des Epithelverbandes.

2. Die interzellulären Sekretkapillaren finden sich jeweils an den Kanten von drei aneinanderstoßenden pyramidenförmigen Epithelzellen. Der Querschnitt des Lumens, in das zahlreiche Mikrovilli hineinragen, ist annähernd rund.

3. Das interacinäre Bindegewebe und das Verhalten der Axone zwischen den Acini werden beschrieben.

4. In den Zellen der Schaltstücke werden Sekretvakuolen und Golgi-Zonen festgestellt. Auffallend ist die Massierung der Mitochondrien in unmittelbarer Nähe des Lumens.

5. Die Epithelzellen der Sekretrohre sind durch drei charakteristische Merkmale gekennzeichnet: Die Zellkerne liegen näher dem Lumen als der Basis, die ganze Zelle ist mit Ausnahme des apikalen Poles dicht von Mitochondrien erfüllt, welche in der breiten basalen Zone in Säulen geordnet sind (Basalstreifung der Lichtmikroskopie). Zwischen den Säulen ist die basale Zelloberfläche mehrfach tief bis in Kernnähe eingefaltet, eine Besonderheit, die mit dem intensiven Wassertransport in Zusammenhang stehen dürfte. In einem Teil der Epithelzellen kommen große multivesikuläre Vakuolen vor, die supranukleär in der Golgi-Zone gelegen sind. Die Feinstruktur der Basalzellen wird beschrieben, ihre Bedeutung für den Zellersatz bildlich belegt.

Literatur

- BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- BENNINGHOFF, A.: Über die Bedeutung der Gangsysteme der großen Speicheldrüsen vom strömungstechnischen Standpunkt aus. Gegenbaurs morph. Jb. **85** (1941).
- CAULFIELD, J. B.: Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissues fixation. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 827 (1957).
- CLARA, M.: Über das Vorkommen von Atractosomen in den Schleimzellen der menschlichen Drüsen. Z. Zellforsch. **25**, 655 (1937).
- Untersuchungen über die Atractosomen und Muzine in menschlichen Drüsen. Z. Zellforsch. **39**, 373—391 (1954).
- Beiträge zur Kenntnis der Sekretgranula in enzymproduzierenden Drüsenzellen des Menschen. Biol. lat. (Milano) **11**, 17—32 (1958).
- FERNER, H.: Bau und Struktur der Speicheldrüsen unter Berücksichtigung eigener elektronenmikroskopischer Beobachtungen am Menschen. 88. Tagg Dtsch. Ges. Zahn-, Mund- und Kieferheilk. in Stuttgart 1960.

- GANSLER, H.: Beitrag zur elektronenmikroskopischen Histologie der Haut. *Acta neuroveg.* (Wien) **18**, 320—334 (1958).
- Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Innervation der glatten Muskulatur. *Acta neuroveg.* (Wien) **22**, 192—211 (1961).
- GAUTIER, A., et V. DIOMEDE-FRESA: Etude au microscope électronique de l'ergastoplasme des glandes salivaires du rat. *Mikroskopie* **8**, 23—31 (1953).
- HAMPERL, H.: Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie menschlicher Speicheldrüsen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **17** (1931).
- HEIDENHAIN, M.: (a) Neue Grundlagen zur Morphologie der Speicheldrüsen. *Anat. Anz.* **52**, 305—331 (1920).
- (b) Über die teilungsfähigen Drüseneinheiten oder Adenomeren sowie über die Grundbegriffe der morphologischen Systemlehre. Berlin: Springer 1921.
- HOFMANN, M.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Sekretgranula der serösen Drüsenzellen in der Parotis. *Berl. Med.* **17**, 393—399 (1959).
- HOEFF, A. VAN DEN: Elektronenmicroscopisch onderzoch ten behoeve van cytologie en histologie. *Academisch proefschrift*, Amsterdam 1957.
- PEASE, D. C.: Infolded basal plasma membranes found in epithelia noted for their water transport. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2** (Suppl.), 203—208 (1956).
- UCH, S.: Quelques problèmes concernant la physiologie des glandes salivaires chez l'homme. — *Méd. et Hyg.* **18**, 298—299, 329, 349 (1960).
- AR Die Speicheldrüsen des Menschen. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- SCHWARZ, W., u. M. HOFMANN: Das Doppellamellensystem in den Drüsenzellen der Parotis. 4. Intern. Kongr. für Elektronenmikr. 1958, Bd. II, S. 369—371. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- SCOTT, B. L., and D. C. PEASE: Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. *Amer. J. Anat.* **104**, 115—162 (1959).
- SJÖSTRAND, F. S., and V. HANZON: Membrane structures of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas as revealed by high resolution electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **7**, 393—414 (1954).
- ZIMMERMANN, K. W.: Die Speicheldrüsen der Mundhöhle etc. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORFF, Bd. 5, S. 61—244. Berlin: Springer 1927.

Professor Dr. H. FERNER,

Histologisches Institut der Univ. d. Saarlandes Homburg a. d. Saar

From the Department of Pathology, Division 1, Kobe Medical College

AN ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF THE NORMAL AND STIMULATED ADRENAL CORTEX IN THE RAT

By

TAKEO YAMORI, SATORU MATSUURA and SAKAE SAKAMOTO

With 18 Figures in the Text

(Received April 22th, 1961)

A. Introduction

The first electron-microscopic investigations on the fine structure of the adrenocortical cells were attempted by BRAUNSTEINER et al. (1955) and LEVER (1955). The relationship between the mitochondria and other organellae, and the function of the adrenocortical cells has been studied by BELT and PEASE (1956, 1958), LUFT and HECHTER (1957), HONJIN et al. (1957), ROSS et al. (1958) and DE ROBERTIS and SABATINI (1958).

It is the task of the present paper to reveal electronmicroscopically those changes of intracellular organellae of the adrenal cortex, which are caused by the administration of ACTH and other stress agents. Special attention is paid to the interrelationship between lipid formation and mitochondria.

B. Method

The animals used were Wistar rats (weight 100 to 150 gm.). The rats were killed by decapitation and bleeding. The adrenal was excised and cut immediately into two pieces through the middle. For fixation the pieces were put into a solution of equal amounts of 2% osmic acid and 1/100 M. phosphate buffer at pH 7.2 and 0.5 M. sucrose.

After two hour's fixation in a refrigerator at 0° C, the material was dehydrated with alcohol and embedded in methacrylate, a mixture of eight parts of n-butyl methacrylate and two parts of n-methyl methacrylate.

Ultra-thin sections were made with Sjöstrand's ultramicrotome (L. K. B.). In sectioning the material, special care was taken to keep the zonal continuity of the adrenal cortex to clarify the location of the observed cells. The sectioning was done continuously from the capsular tissue to contain the cortex without interruption. The cutting surfaces were selected from several parts of one block. A Tronscop 50-E (Akashi Co.) electron-microscope was used.

There were several groups of experiments:

1. Normal controls (thirty two rats were used).
2. Formalin and cold stresses. Four per cent formalin (0.1 cc.) was injected once into the back muscle of the rats. Animals were sacrificed $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after the injection. Forty two animals were used in this experiment.
- In order to produce a cold stress, seventeen animals were placed in a refrigerator at —2° C. for 2 hours. Animals were sacrificed immediately or at 2, 3, 6, 12 and 24 hours after replacement to normal temperature.
3. Long term formalin administration. The animals were killed after 0.1 cc. or 1.0 cc. daily injection of 4% formalin. Six rats were used.
4. Single administration of ACTH. The animals were killed 6, 12, 24 and 48 hours after an intramuscular injection of 10 mg. of Gel-ACTH (Armour Co.). Twelve animals were used in this series.
5. Continuous ACTH injection. The animals (five rats) received daily injections of 2 mg. ACTH and were sacrificed after twenty one days.

C. Results

I. The fine structure of the adrenocortical cells in normal rats

The capsule of the adrenal gland consists of several layers of long, flat fibroblasts. No other types of cells could be distinguished among the fibroblasts of the capsule, though sometimes the existence of special cells had been reported. The arrangement of the cells of the zona glomerulosa was found to be irregular and to consist of crowded round, polygonal, and variously shaped cells. Flat cells were also found and in some places there were narrow vascular spaces, which were less noted in the zona glomerulosa as compared with the two other layers.

1. The cells of the zona glomerulosa. The cell of the zona glomerulosa contains mitochondria, endoplasmic reticulum (smooth surfaced variety), special vacuoles and a Golgi apparatus. The mitochondria observed were mainly globular or short rods, measuring approximately 0.5μ in size. The mitochondria showed a tubular or honeycomb-like structure different from the cristae mitochondriales commonly seen in other organs. A smooth surfaced endoplasmic reticulum appeared in the form of vesicles and long tubules (0.05μ ; $0.5-1\mu$), diffusely distributed in the cytoplasm. The rough surfaced variety of endoplasmic reticulum could not be found. Beside these fine vesicular structures, large round vacuoles (approximately 1.0μ in diameter), surrounded by thick and irregular membranes, sometimes were noted. These vacuoles were usually found, but occasionally lacking in normal rats. This type of vacuole was called Type A-vacuole (Fig. 1). Most of these vacuoles were completely empty.

2. The cells of the zona fasciculata. There were two groups of zona fasciculata i.e. clear and dark cells. In the clear cells, the intracellular structure was readily seen under the electron microscope, whereas the electron density of the dark cells was generally so high that the intracellular structure became indistinct (Fig. 2).

No essential difference either in the fine structure of the cytoplasm or in the structure of the individual organellae could be seen between the clear and dark cells. The mitochondria are small round bodies approximately 1.0 to 1.5μ in diameter. The external membrane of the mitochondria is composed of three layers, i.e. two electron dense membranes and one light in between. Inside the mitochondria, a number of fine vacuoles (approximately 300 \AA in diameter) surrounded by electron dense membranes were seen. They showed a honeycomb-like appearance in section, different from that in the zona glomerulosa. However, there were transitional forms between the external layer of the zona fasciculata and the inner cells of the zona glomerulosa. Uniformly sized, round or tubular vesicles with diameters of approximately 100 \AA were scattered diffusely between the mitochondria. Such tubular vesicles were approximately 0.1μ in length. Vacuoles surrounded by a thin membrane were noted, which were as large as or several times larger than the mitochondria. Among those vacuoles comparatively large vacuoles surrounded by a somewhat thicker external membrane were situated; they were called Type B-vacuoles (Fig. 16). Somewhat smaller vacuoles surrounded by a thin membrane are called Type C-vacuoles (Fig. 17).

The vacuolar structures were morphologically different to some extent among themselves. Some were empty, while others contained a flocculent substance of low electron density.

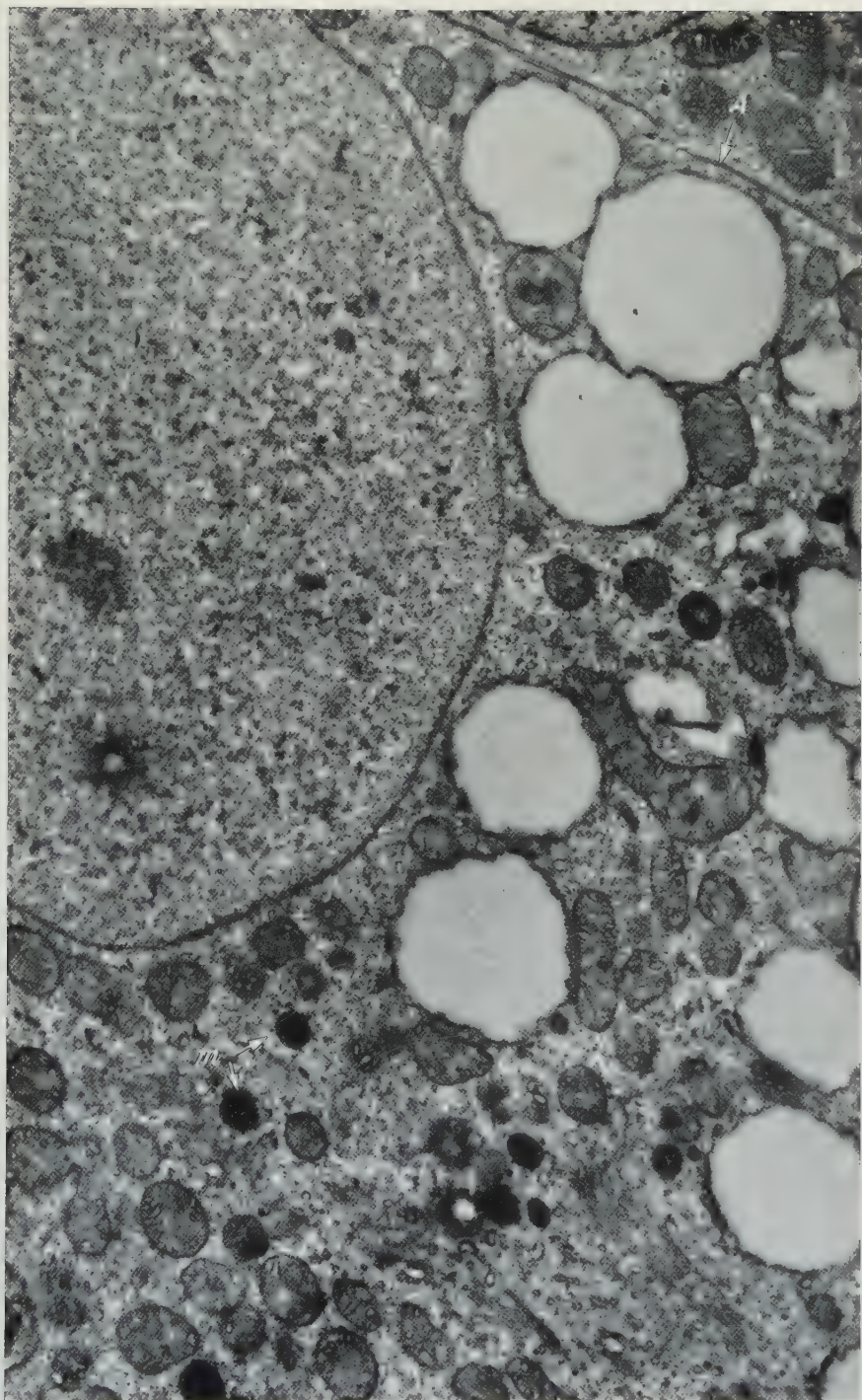


Fig. 1. Cell of the zona glomerulosa. Many rod-shaped mitochondria and fine vesicles are scattered in cytoplasm. The specific vacuoles ("Type A") are seen (A↓). (m↓) shows so called microbodies. 21000 ×

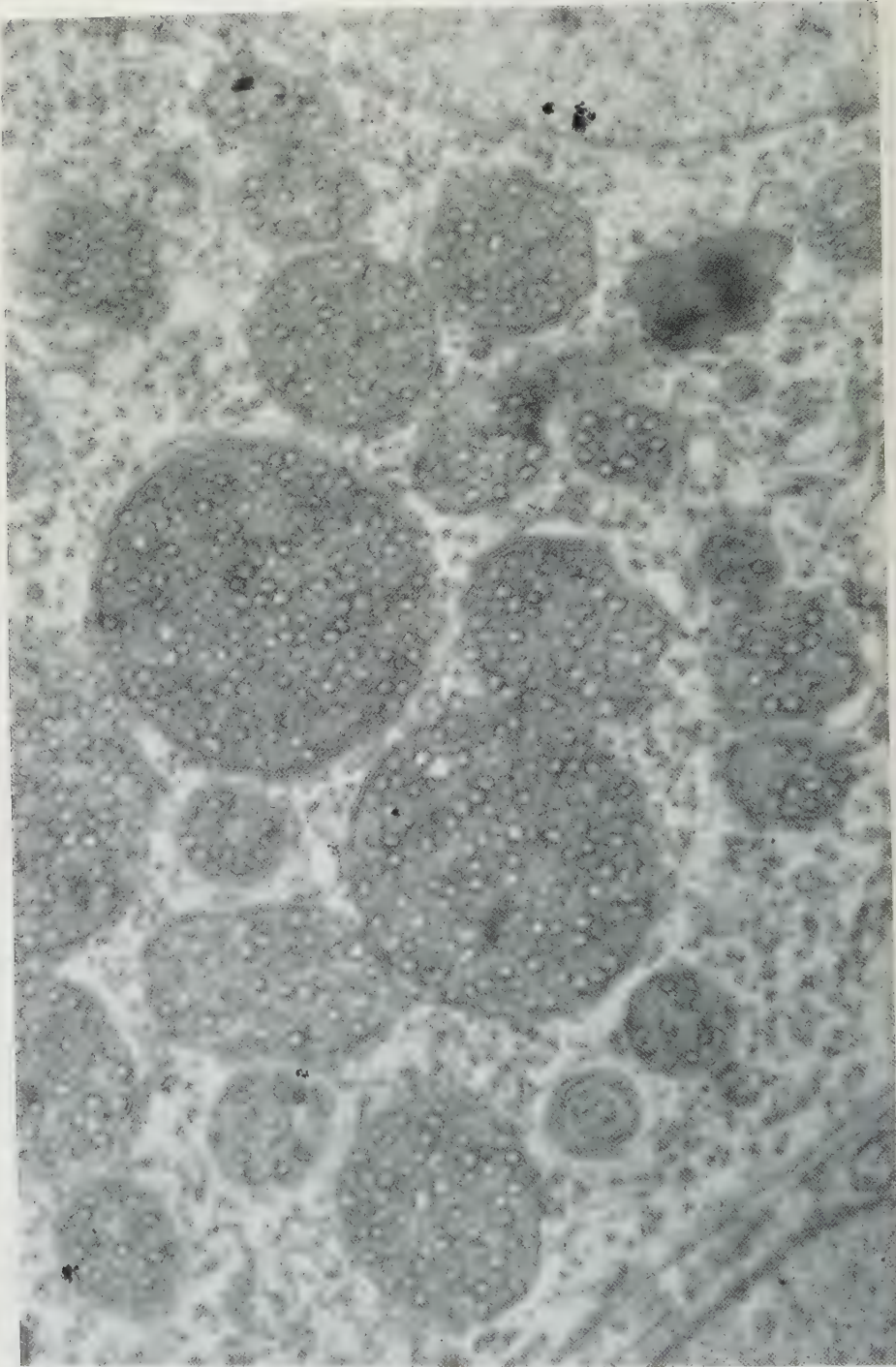


Fig. 2. Mitochondria in cell of the zona fasciculata. Round mitochondrias membrane is composed by two electron dense membranes and one less dense layer between them. Inside of the mitochondria honeycomb-like structures. 70 000 \times

Sometimes a comparatively well developed Golgi apparatus, mainly consisting of vacuoles and granules, was found in the center of the cell.

Besides these organellae, osmiophilic granules of high electron density were observed frequently. These granules were classified into four types according to their morphological features:

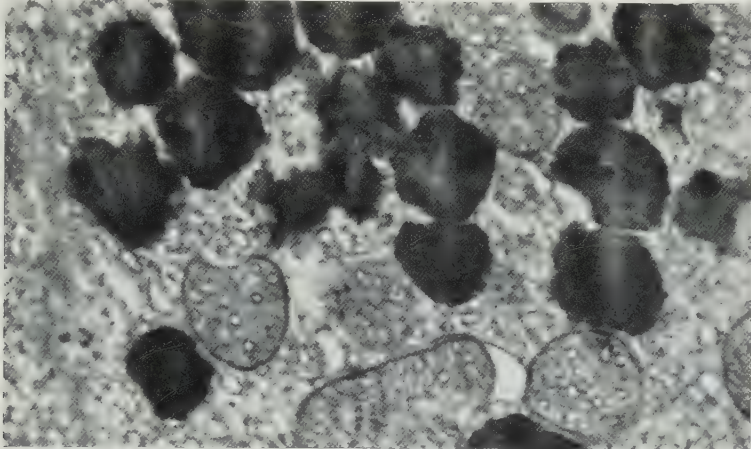


Fig. 3. Type I. Small granules of high electron density. 21000 \times

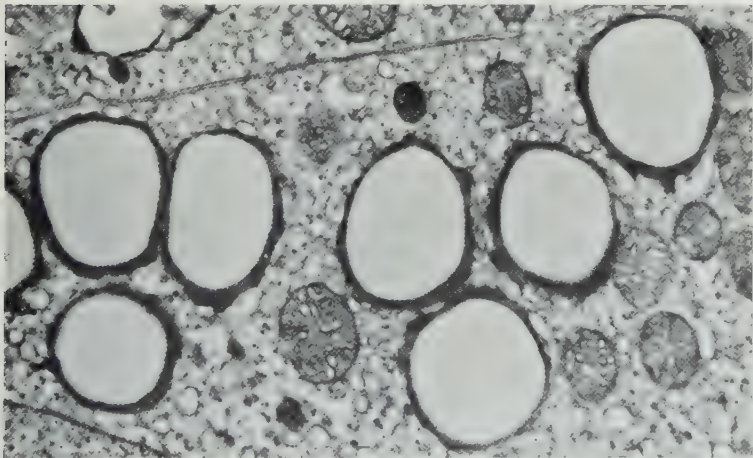


Fig. 4. Type II. Small empty granules with wall of high electron density. 21000 \times

Type I. Small compact granules of high electron density. The Type I-granule was almost round or irregular in shape, approximately 1.0 to 1.5μ in diameter. It was frequently observed in the cells of the zona glomerulosa and of the external layer of the zona fasciculata (Fig. 3).

Type II. Small "empty" granules. This type was a round granule with a diameter of about 1.0μ . It was quite empty and surrounded by an electron dense layer. Those granules were mainly observed in the cells of the zona fasciculata (Fig. 4).

Type III. Small, multivesicular granules of high electron density. This granule is thought to be a subtype of Type II. It was mainly found in the cells of the zona fasciculata (Fig. 5).

Type IV. Large, compact granules of high electron density. These granules varied in size, some of them having a diameter of more than several microns.

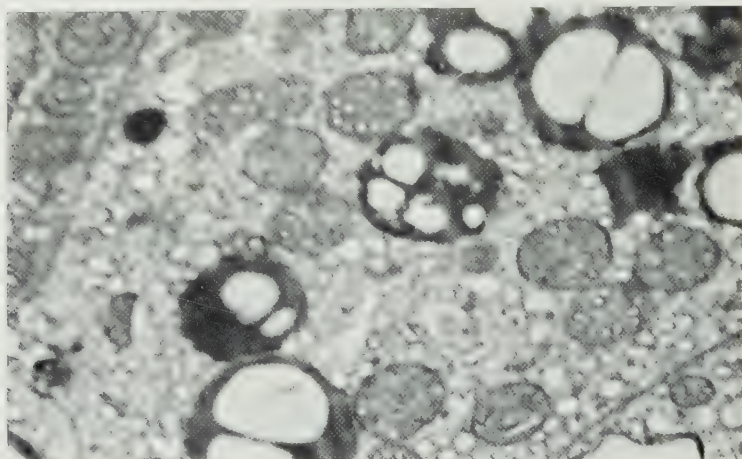


Fig. 5. Type III. Small multivesicular granules. 21000 \times

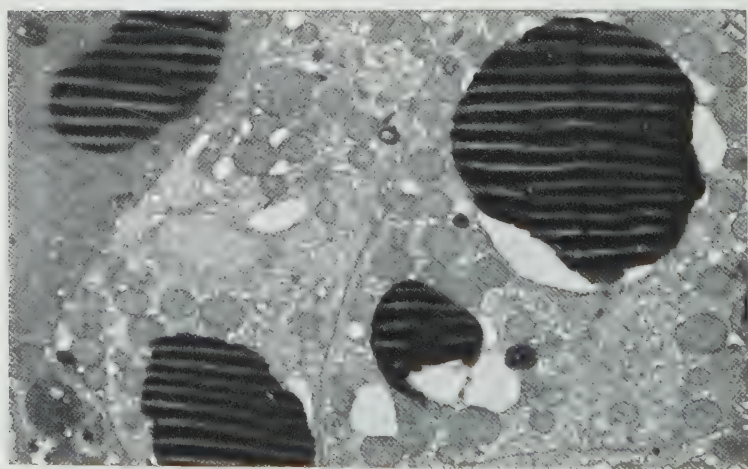


Fig. 6. Type IV. Large granules of high electron density. 7000 \times

They were mainly found in the cells of the zona reticularis or in the cells of the internal layer of the zona fasciculata (Fig. 6).

A number of Type I-, II- and III-granules respectively were found in one cell, but Type IV-granules were seen only one or two per cell. Granules found in one cell always belonged to the same type.

The foregoing observations apply to the intracellular structure of the clear cell. The dark cells showed high electron density as a whole owing to the closely

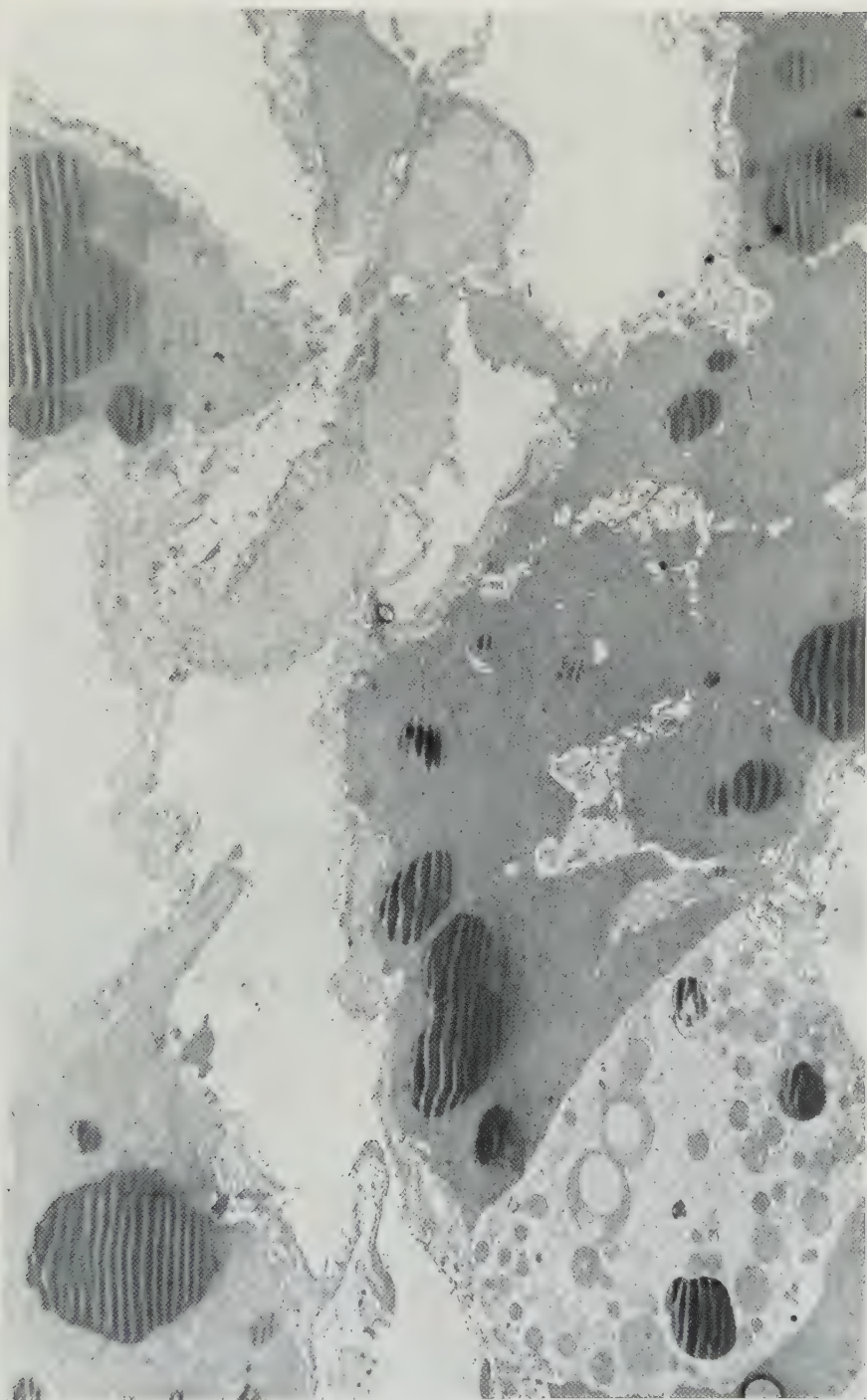


Fig. 7. Zona reticularis, normal structure. Chiefly composed of so called dark cells.
5000 \times

packed mitochondria, but the fine structure of the cellular organellae did not differ from that of the clear cell.

The clear cells were abundant in the external layer of the zona fasciculata, whereas the dark cells were more frequently seen in the internal layer.

3. The cells of the zona reticularis. The findings resemble those described for the cells of the zona fasciculata; there was no essential difference in fine structure. However, there were fewer organellae than in the cells of the zona fasciculata. Especially the smooth surfaced variety of the endoplasmic reticulum could not be seen as a rule. Therefore these cells give an impression of sparseness in cellular structure. On the other hand, in the zona reticularis, dark cells were more numerous than clear cells (Fig 7).

4. The structure of the lining of the vascular lumen. The vascular lumen was covered by a layer of flat endothelial cells. Between the endothelial and the parenchymal cells, a space similar to Disse's space of the liver was seen. Into this space reach the microvilli of the parenchymal cells. In addition, similar processes exist between neighbouring parenchymal cells to form an intercellular space connected with the subendothelial space. In the membranous cellular processes of the endothelial cells fine pores, approximately 0.2μ in width, connect the vascular lumen with the subendothelial space (Fig. 8).

II. Animals subjected to stresses

1. Animals exposed to formalin stress. Finding after thirty minutes: There was an increase of mitochondria in the cells of the zona glomerulosa, but hardly any large round vacuoles or granules of high electron density could be seen. An increase of smooth surfaced endoplasmic reticulum in the cells of the zona fasciculata was noted and, in addition, flocculent substances with low electron density were found filling either the intercellular and subendothelial space, or the vascular lumen.

Finding after two hours: Giant vacuoles in the cells of the zona fasciculata were observed (Fig. 9). These vacuoles occasionally occupied more than half the sectioned area of the cell. Each vacuole was surrounded by an indistinct thin membrane and filled with a flocculent substance of low electron density. In some cases, a small area which was formed by the disappearance of mitochondria or other organellae was seen. The organellae are transformed into granules of low electron density (Fig. 10). Such areas seem to represent an early stage of the vacuole formation. In comparatively healthy cells there were no large vacuoles, but the mitochondria had lost their normal architecture. One or few small vesicles were present in them. Due to these small vesicles the honeycomb structure of mitochondria is suppressed peripherally. Various stages from these small vesicles to an almost complete vacuolisation of the whole mitochondrion were also observed. Other intracellular organellae gave an impression of rarefaction. Otherwise, hardly any marked alterations could be noted in the cells of the zona glomerulosa.

In the intercellular and subendothelial spaces, and in the vascular lumen, various incompletely destroyed organellae were seen. Perhaps these features indicate a release of the intracellular components into the blood stream or a detachment of the cortical cells in emergency.

Finding after three hours: In some instances a number of Type II (small, empty) and Type III (small, multilobular) granules of high electron density in the cells of the zona fasciculata were observed.

Finding after six hours: No more formation of cytoplasmic vacuoles or vacuolisation of mitochondria in the cells of the zona fasciculata were observed. An increase of normal mitochondria was seen. Small, round bodies as large as, or two or three times larger than, mitochondria appeared. These bodies were surrounded by a membrane of high electron density. Though these bodies had a

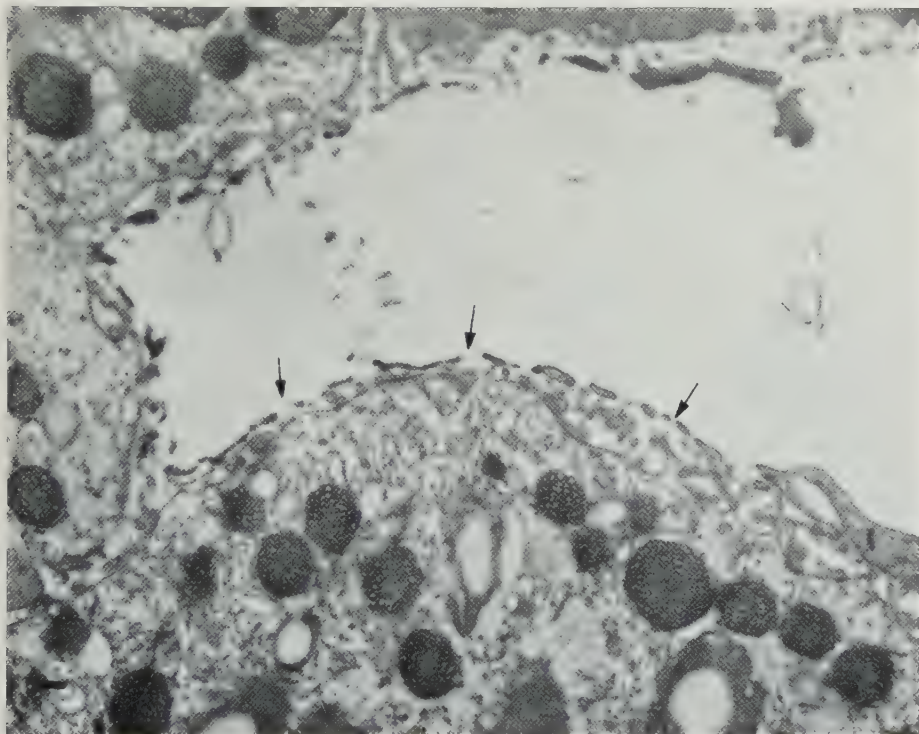


Fig. 8. The wall of a vessel. Lumen is lined by flat, fenestrated endothelial cell. The space between endothelial cytoplasm and microvilli of the parenchymal cells, connected with intercellular space, is called subendothelial space. 12000 \times

shape similar to that of Type I- or II-granules of high electron density they were classified as Type D-granules (Fig. 11) according to their low electron density. Various granules of similar nature, e.g. granules of low electron density, hollow granules, etc., were also seen. The granules in one cell, as a rule, belonged to the same type. Among these comparatively normal cells, necrotic cells were found. The nuclei and cytoplasm of these necrotic cells are atrophic and their organelles can hardly be distinguished, owing to the general high electron density (Fig. 11).

Finding after twelve to twenty four hours: A number of Type I- and II-granules of high electron density in the cells of the zona glomerulosa and zona fasciculata were seen, but other organelles kept their normal structure. Neither giant vacuoles and deformed organelles nor necrotic cells were present. After forty

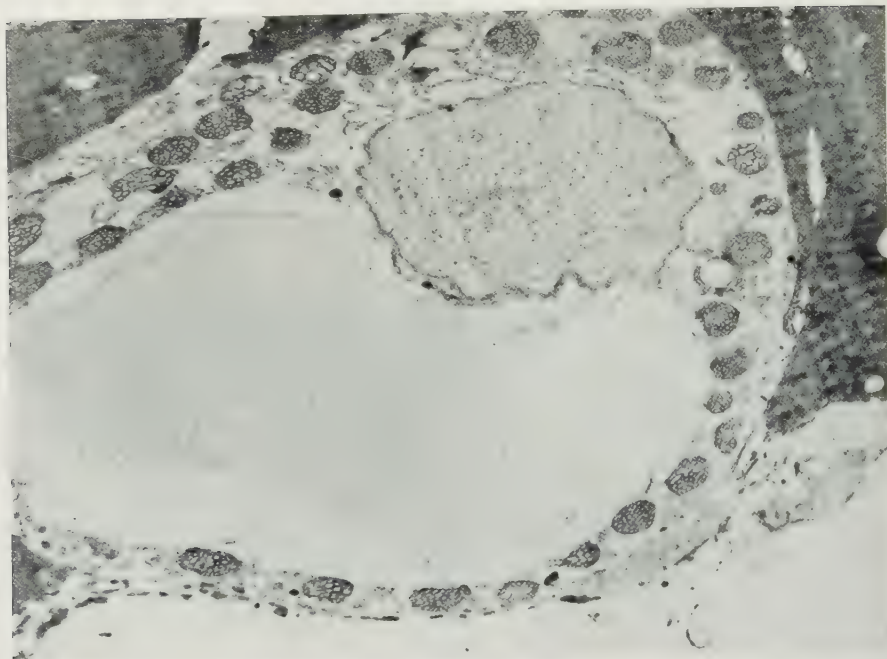


Fig. 9. Giant vacuoles in a cell of the zona fasciculata, observed two hours after formalin stress. 8000 \times

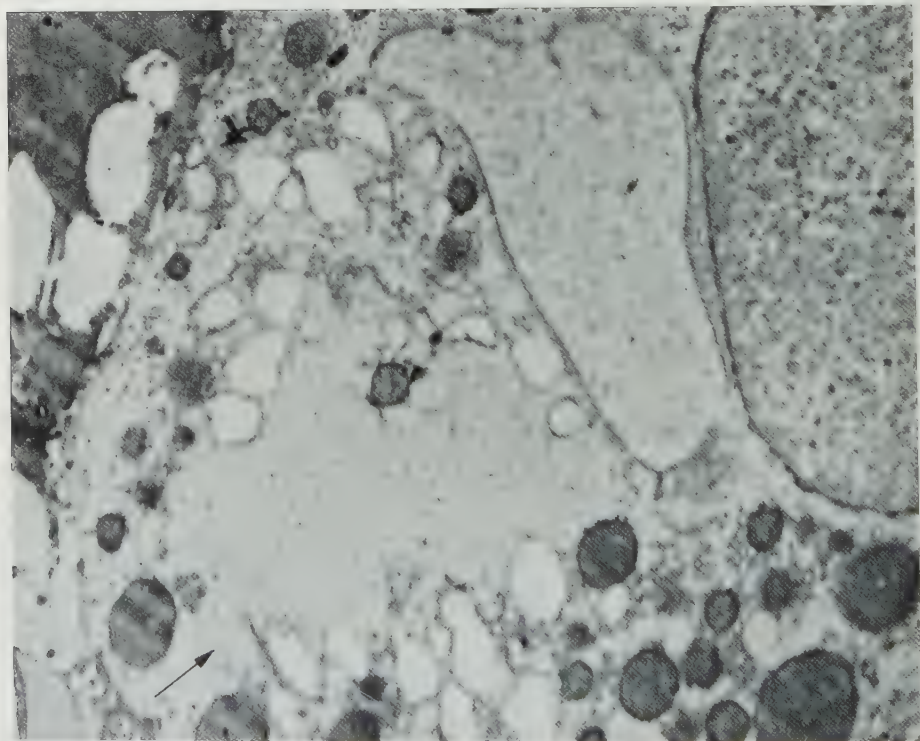


Fig. 10. Cf. Fig. 9. A small area indicated by \downarrow shows the precursor of a vacuole, produced by disappearance of intracellular organelles. 10000 \times

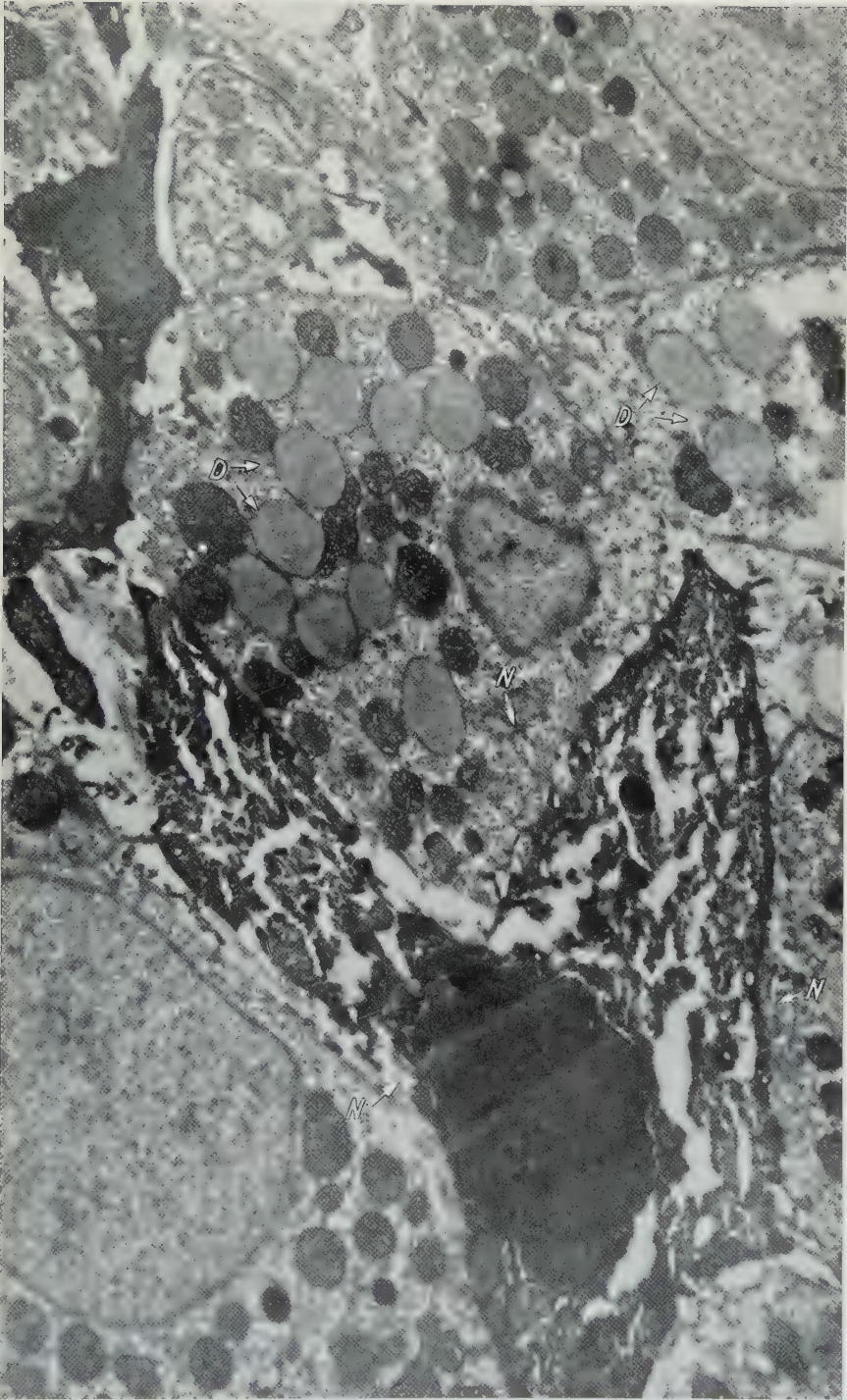


Fig. 11. Zona fasciculata six hours after formalin stress. Specific granules ("Type D") disposed in cytoplasm. (N↓): necrotic cells. 10 000 ×

eight hours, all the significant changes mentioned above were no longer seen and the cells were restored to the normal state.

2. Animals exposed to cold stress. Alterations resembling those after formalin stress were found. In addition, two to four hours after the exposure to cold stress, a tubular or cystic, smooth surfaced endoplasmic reticulum; approximately

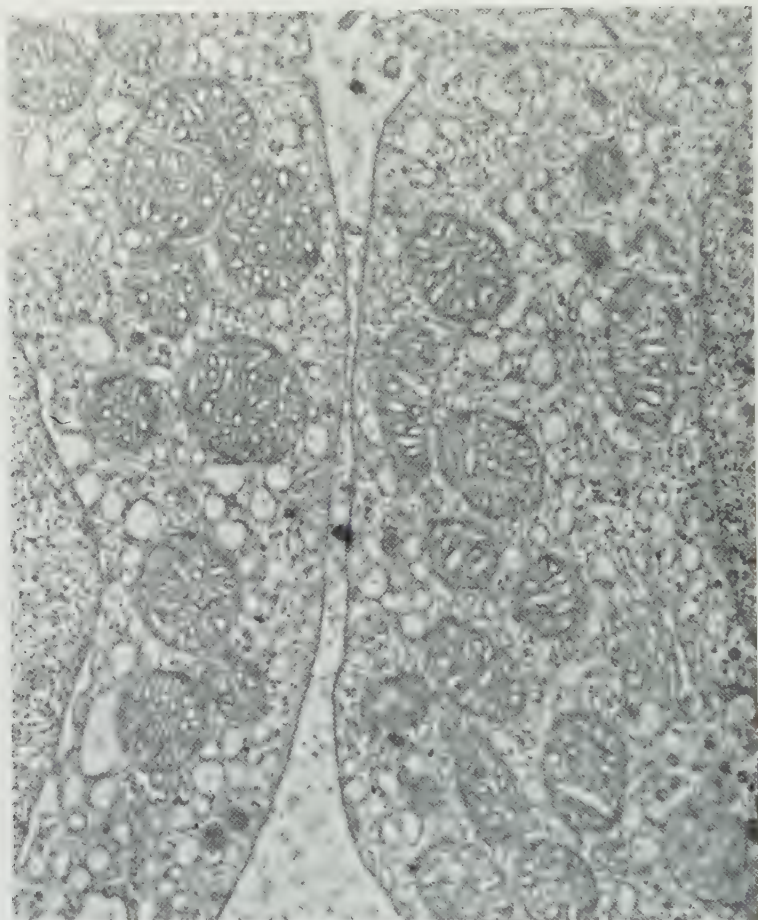


Fig. 12. Cell of the zona fasciculata six hours after administration of 10 mg. ACTH. Fine vesicles scattered in cytoplasm. 15000 \times

0.05 μ in diameter, or cystically enlarged membranous structures adjacent to mitochondria were observed. The membranes were connected to the external membrane of the mitochondria and presumably formed protrusion from the latter.

III. Observations of animals exposed to prolonged formalin stress

Findings were similar to those after the repeated ACTH administration, described below. The only difference between these two groups was the occasional appearance of cells with Type D-granules or with giant vacuoles, or with necrotic change in the cells of the zona fasciculata in the stress group.

IV. Observations of animals treated with ACTH

1. Animals with short term ACTH administration. After six hours: A diffuse appearance of small vesicles of approximately 0.4μ diameter was observed in the external layer of the zona fasciculata. The vesicles very likely belonged to the smooth surfaced variety of the endoplasmic reticulum. The inside of the vesicles was empty. A number of small, compact Type I-granules of high electron density were also observed. However, in other organellae no marked changes were noted (Fig. 12).

After twelve hours: A marked increase of small vesicles of approximately 0.5μ to 0.8μ diameter in the cells of the zona fasciculata, especially in the external layers, similar to those observed after six hours, was noted. No marked changes could be seen in the interior of the mitochondria but occasionally a tubular structure was mixed with one like a honeycomb. In some cases, cells with a number of Type I- or II-granules of high electron density were especially numerous, and cells with large granules of high electron density, approximately 3.0 to 4.0μ in diameter, or cells with confluence of Type I-granules resembling a cluster of grapes were also found.

After twenty four to forty eight hours: A number of granules of high electron density similar to those observed after twelve hours were noted especially.

2. Animals with prolonged ACTH administration (twenty one times). No Type A-vacuoles in the cells of the zona glomerulosa were noted. The number of Type I-granules of high electron density accompanied by mitochondria of different sizes appeared to be increased. In the cells of the zona fasciculata, an increase of Type I- and Type II-granules of high electron density, especially of the latter, with an abundance of fine vesicular endoplasmic reticulum (smooth surfaced variety) were observed (Fig. 13). No changes in the structure of the mitochondria could be seen. In the internal layer of the zona reticularis, a number of Type IV-granules were frequently observed.

D. Discussion and Summary

1. Mitochondria. It should be noted that mitochondria of the adrenocortical cells have a characteristic internal structure, resembling a honeycomb in section. According to BELT and PEASE (1956), such mitochondria are found at sites of steroid hormone secretion, such as the corpus luteum, the theca interna, and the granulosa of the Graafian follicle. It might be said that honeycomb structure is specific for organs secreting lipid hormones. The honeycomb structure of the mitochondria of the adrenocortical cell can undergo the following alterations under certain conditions.

a) *Vacuolisation.* A series of mitochondria with vacuolisation from a normal to severe degree is shown in Fig. 14. It seems as if small vesicles, produced inside the mitochondria, become gradually larger, fuse together and finally occupy the whole mitochondrion. Fig. 14b shows a remnant of honeycomb structure in a mitochondrion. The vacuolisation of mitochondria is thought to be related to the process of lipid granule formation.

b) *Deposition of an electron-dense substance in the mitochondria.* It is observed that an area of high electron density appears in the central part of mitochondria, as Fig. 15 shows, and that it enlarges gradually. This seems to be a deposit of

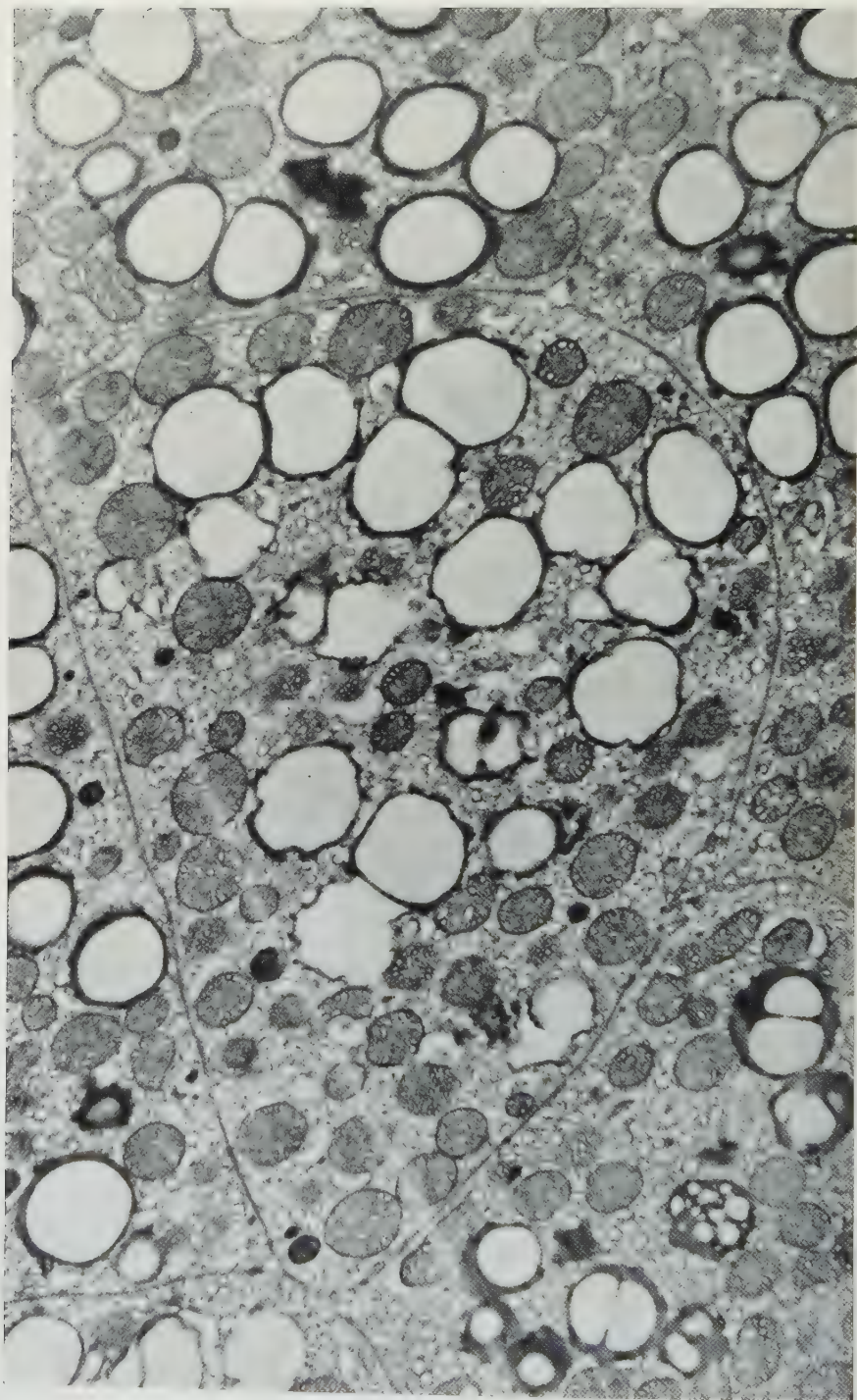


Fig. 13. Cell of the zona fasciculata of rat. Injection of ACTH, twenty one days. Many granules of Type II and Type III. 15000 \times

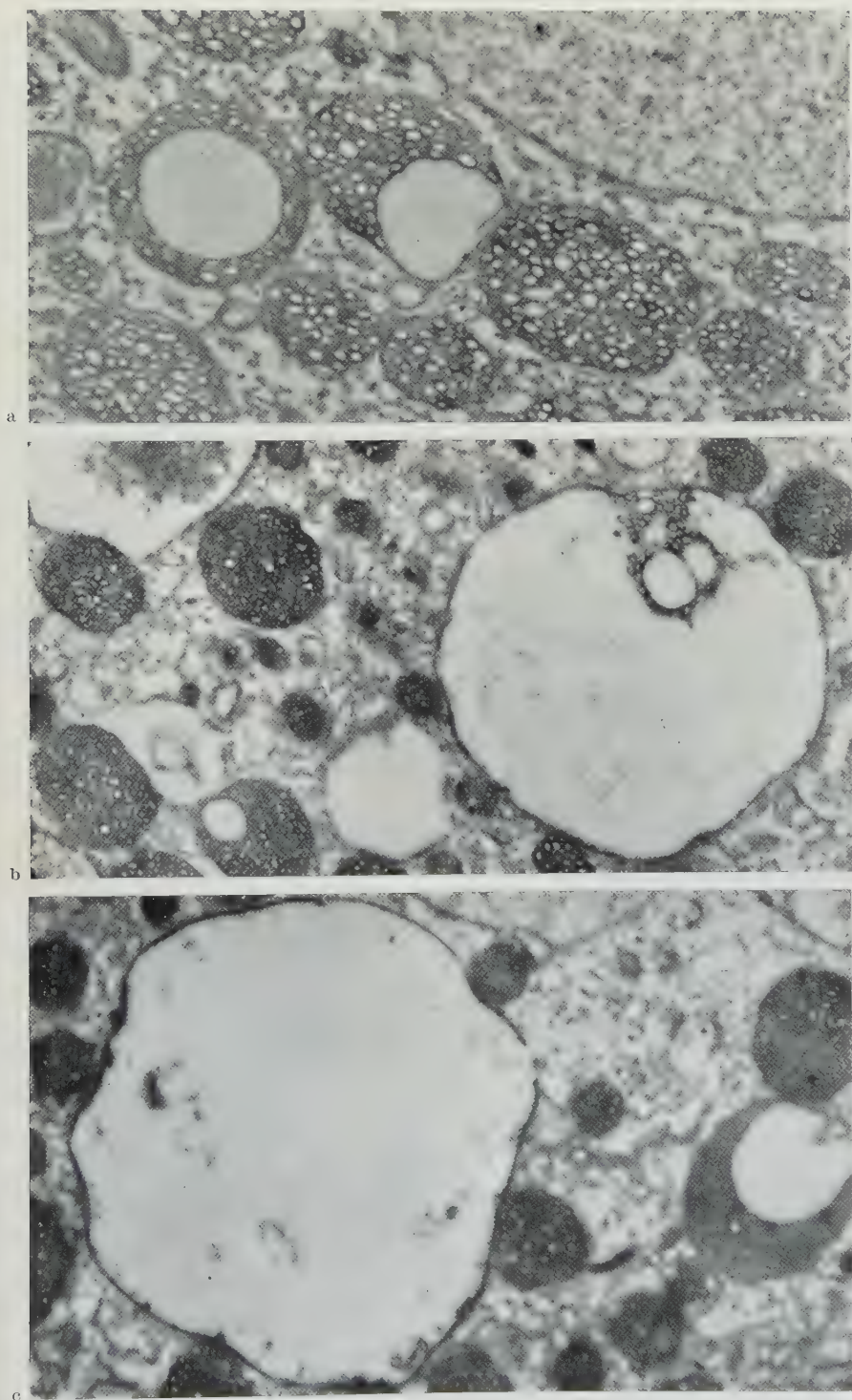


Fig. 14a—c. Vacuolisation of mitochondria. a: 21000 \times ; b: 18000 \times ; c: 18000 \times
13*

some electron dense substance inside the mitochondrion. SAKAGUCHI et al. (1956) observed similar changes in the mitochondria of the tubular epithelium of Masugi nephritis and thought that they might correspond to a process of lipid granule formation. LEVER (1956) assumed lipid formation inside of the mitochondria in the adrenocortical cells. Against these theories, BELT (1958) pointed out that both mitochondria and lipid are produced from microbodies.

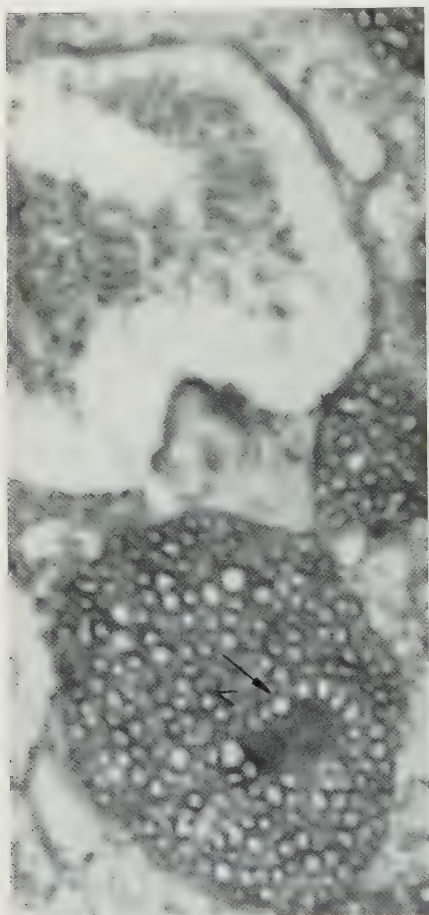


Fig. 15. Electron dense substance within a mitochondrion (\downarrow). 42000 \times

We, however, assume that lipid formation is not a simple process, but varies according to different types of lipid granules, the accumulation of material of high electron density inside of mitochondria is thought to be one mode of lipid granule formation.

c) Vacuolisation due to the protrusion of the external membrane of mitochondria. In adrenals of the cold stress group, cystic protrusion of the external membrane of mitochondria, and vacuoles thus formed are frequently noted. Some of those vacuoles become separated from mitochondria. Some vacuolar structures in the adrenocortical cells are thought to be produced by the cystic protrusion and the separation of the external membrane of mitochondria. Such vacuoles could be identified as so-called smooth surfaced variety of endoplasmic reticulum (Fig. 17). But on comparing the newly formed vacuoles derived from mitochondria with the smooth surfaced endoplasmic reticulum found in normal adrenocortical cells, the former are large and irregular in size and shape and have extremely thin membranes in contrast to the normal fine vesicles.

2. Golgi apparatus. Definite Golgi bodies are rarely observed in the adrenocortical cells. This may be due to either the poor development or the small size of these bodies.

3. Small vesicles. Endoplasmic reticulum belonging to the rough surfaced variety cannot be found in the adrenocortical cells. The smooth surfaced variety of endoplasmic reticulum observed consists of fine, small vesicles. It is most abundant in the cells of the zona glomerulosa and less in the cells of the external layer of the zona fasciculata. It is only rarely found in the internal layer of the same zone and in the cells of the zona reticularis. Following the administration of formalin or ACTH, these vesicles (smooth surfaced variety of endoplasmic reticulum), especially the larger elements increase in number.

Based on the evidence of an increase in number of the smooth surfaced variety of endoplasmic reticulum in organs with active lipid metabolism, PALADE (1955) and Ross et al. (1958) have assumed a correlation between these. If this assump-

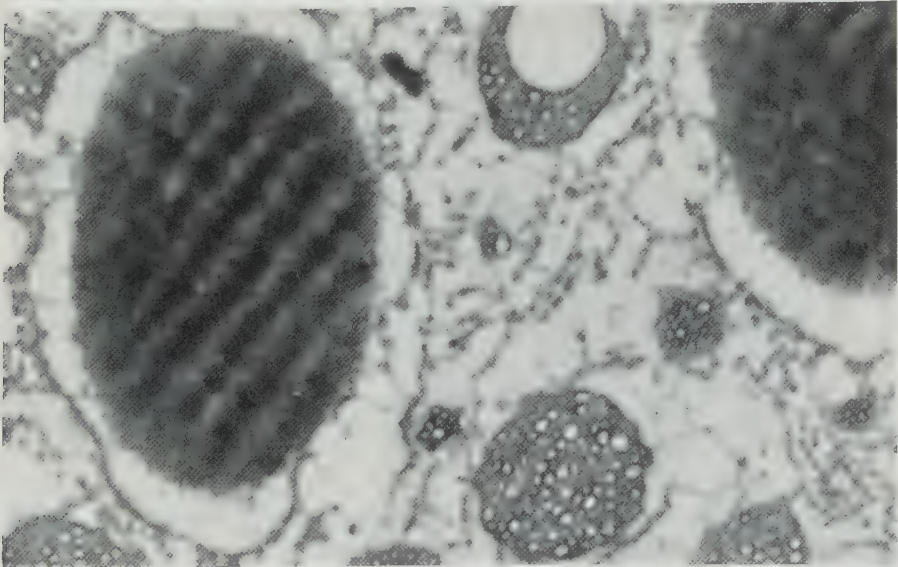
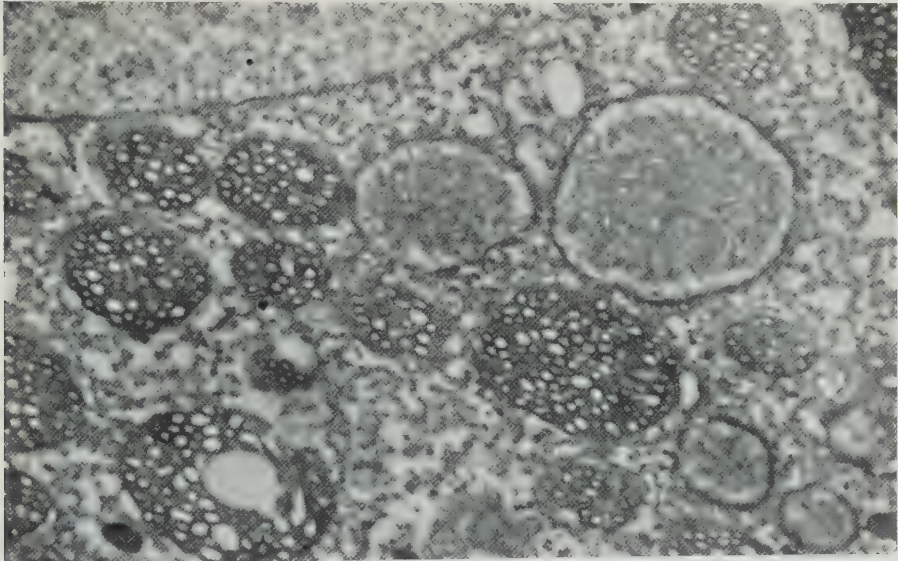


Fig. 16a and b. Deposition of substance in Type B-vacuoles. Possibly electron dense granules are formed by this process (accumulation of unknown substances in vacuoles). a: 24500 \times ; b: 24500 \times

tion is valid, our findings perhaps indicate that the lipid metabolism of the adrenal cortex is accelerated by administration of ACTH or by formalin stress.

4. Granules of high electron density. The granules of high electron density observed in the adrenocortical cells, which have been classified as Types I, II, III and IV, are probably lipid granules. The initial formation of granules may

occur inside the mitochondria. This seems to be true especially for the small, compact Type I-granules and large, compact Type IV-granules.

The second possibility of lipid formation is that of a deposition in vacuoles. i.e. an accumulation of flocculent material of low electron density which gradually becomes dense and turns into lipid granules. This process is shown in Fig. 16.

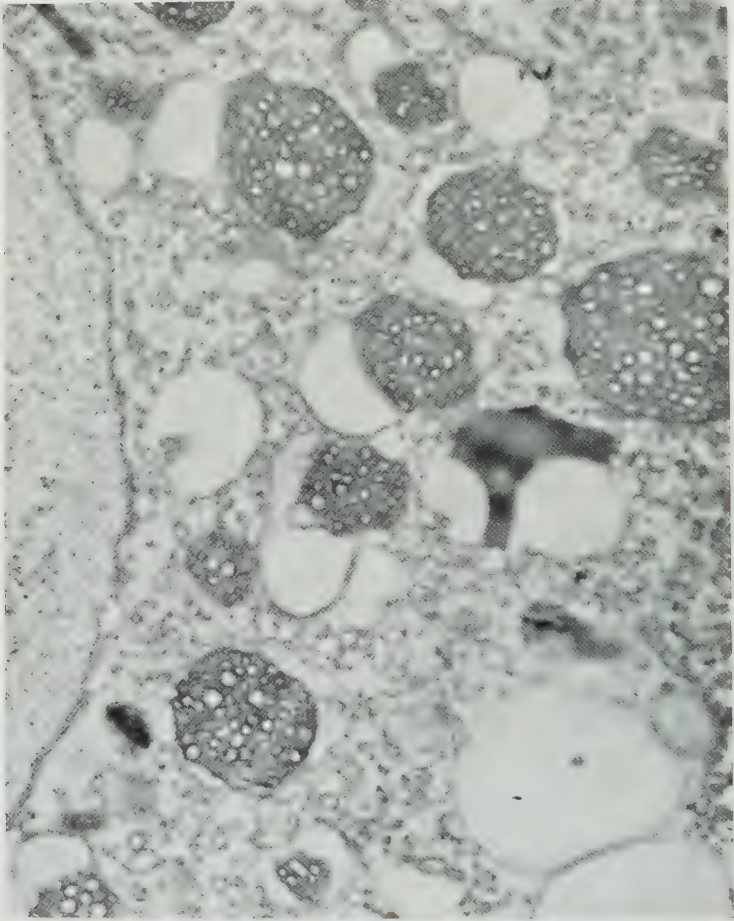


Fig. 17. Protrusion of the external mitochondrial membrane. Protruded membranes are separated from mitochondria and produce vacuoles of Type C. 28000 \times

The round or oval vacuoles surrounded by relatively thick membranes are filled with substances of various electron density. These vacuoles, as mentioned above, are thought to be produced by a vacuolisation within mitochondria or by protrusion of the external membrane of the mitochondria.

As the third possibility, attention must be paid to the Type D-granule of low electron density observed after ACTH administration or formalin stress. These granules are scattered in one cell type in large numbers and are uniform in size, being as large as mitochondria. Type D-granules have two subtypes, one compact the other empty, and *observed also* various transitional forms are observed from

typical Type D-granules of low electron density to the small, compact Type I-granules and small, *empty Type II*-granules of *high electron density*. As the origin of Type D-granules, the vacuoles produced by the cystic protrusions of the external membrane of mitochondria can be taken into consideration. The process of lipid granule formation in Type D-granules would then be identical to that of the second possibility, i.e. the accumulation of flocculent masses in vacuoles. It is concluded that Type I- and IV-granules are produced by accumulation of

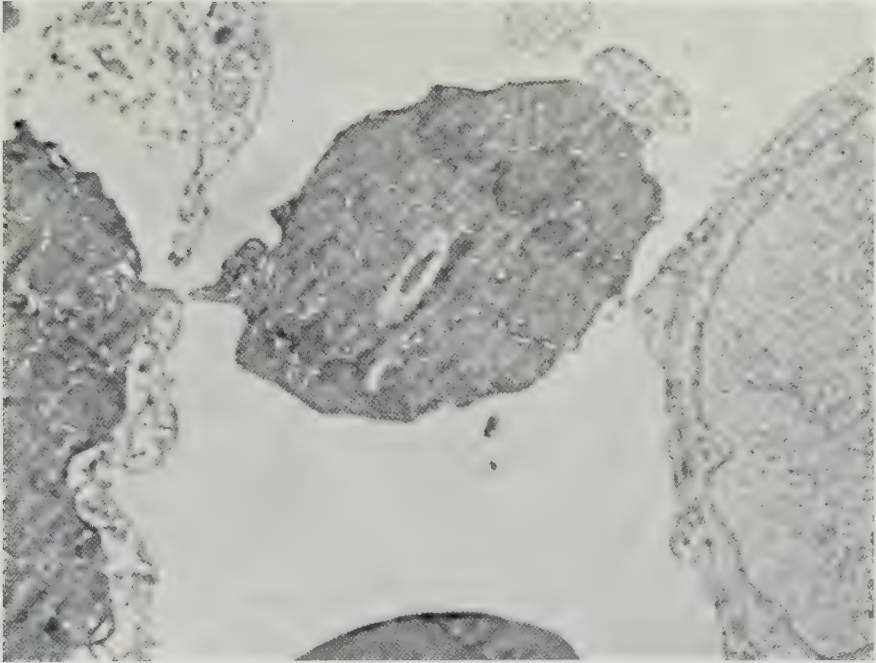


Fig. 18. Outflow of a part of a dark cell's cytoplasm into the vascular lumen through the fenestrated endothelium. 12000 \times

lipid substance in the mitochondrion itself, and Type I-, II- and III-granules by accumulation of lipid in vacuoles formed by cystic protrusions of mitochondrial membranes. Type IV-granules arise in vacuoles derived from mitochondria themselves.

5. Summary concerning vacuole structure. The vacuoles in the adrenocortical cells are classified as follows:

1. Genuine vacuole of normal adrenocortical cells (Type A-vacuole).
2. Functional vacuole connected with metabolism of lipid hormone.
 - a) Vacuole forming within mitochondria (Type B-vacuole).
 - b) Vacuole derived from the protrusions of external mitochondrial membrane (Type C-vacuole).

3. Degenerative vacuole, produced by dissolution of cytoplasm (cytolysis).

The genuine Type A-vacuoles are occasionally seen in the cells of the zona glomerulosa of the normal rat. Their function is still unknown.

Functional vacuoles produced by mitochondria are closely related to the formation of lipid granules.

Finally, degenerative vacuoles, occurring in stress, are probably produced by dissolution of cytoplasm.

SELYE (1950) interpreted the formation of vacuoles in the cytoplasm of adrenocortical cells after stress as indicative of holocrine secretion by cytolysis. Signs of dissolution of the cytoplasm as observed by electron microscopy also verified the existence of the holocrine type of secretion in adrenocortical cells. The presence of organellae in the subendothelial and vascular lumen in early stages of stress speaks in favour of this hypothesis. The small pores of the endothelium may form a pathway for cytoplasm and organellae to reach the blood stream. Fig. 18 seems to demonstrate this phenomenon.

Conclusion

Electron-microscopic studies of the adrenal cortex of normal rats and after ACTH administration and stress (induced by cold or formalin) had the following results:

1. In the capsular tissue, no special cells were found but fibroblasts. No specific cellular layers, named by some authors the transitional layers, were found.

2. The mitochondria of the adrenocortical cells were characterised by a honeycomb appearance in section, which is different from that of other cells. Small pores of the vascular endothelium were noted. An outflow of material through these pores suggests an interrelationship with the secretory mechanism, especially with the holocrine type of secretion.

Besides mitochondria, in normal adrenocortical cells, the smooth surfaced variety of endoplasmic reticulum was found. Most of these elements are in the zona glomerulosa, less in the zona fasciculata and in the zona reticularis. No rough surfaced variety of endoplasmic reticulum was seen.

3. In the exhausted stage of severe stress, vacuole formation due to cytolysis was found. At the same time various organellae in the subendothelial space and in the vascular lumen were noted.

4. In adrenocortical cells in a hyperfunctional state, due to the administration of ACTH or stress induced by formalin (7 days), an increase of the smooth surfaced variety of endoplasmic reticulum and various vacuoles, and an appearance of granules of high electron density, as well as mitochondrial changes were observed.

5. Among morphological changes of the mitochondria, vacuolisation, deposition of substances, and vacuole formation due to the protrusion of the external membrane of the mitochondria were observed.

6. Granules of high electron density, presumably lipid, were found in the adrenocortical cells and classified into four types. Type I, small, compact granules of high electron density; Type II, small, *empty* granules; Type III, small, empty, multilobular granules; Type IV, large, compact granules of high electron density. Type I-granule was mainly found in zona glomerulosa and external layer of zona fasciculata. Type II- and III-granules were found in zona fasciculata. Type IV-granule was found in zona reticularis.

Seldom different types of granules were found in one cell.

The formation of granules has been discussed. These granules are considered to originate from the mitochondria themselves and from the vacuoles formed by the mitochondria.

7. The vacuoles in the adrenocortical cells are classified into three types, i.e. the genuine vacuole of normal adrenocortical cells, the functional vacuole connected with lipid hormone metabolism (vacuole formation within mitochondria and derived from the protrusion of the external membrane of mitochondria), and the degenerative vacuole produced by dissolution of cytoplasm (cytolysis).

References

- BELT, W. D.: The origin of adrenal cortical mitochondria and liposomes. A preliminary report. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 337—340 (1958).
- , and D. C. PEASE: Mitochondrial structure in site of steroid secretion. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2** (Suppl.), 369—374 (1956).
- BRAUNSTEINER, H., K. FELLINGER u. F. PAKESCH: Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Mitochondrien in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. *Wien. Z. inn. Med.* **36**, 281—288 (1955).
- DE ROBERTIS, E., and D. SABATINI: Mitochondrial changes in the adrenal cortex of normal hamsters. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 667—670 (1958).
- HONJIN, R., S. IZUMI and T. NAKAMURA: Electron microscopic studies on the adrenal cortex. *Kaibogaku Zasshi* **32** (Suppl.), 1 (1957).
- LEVER, J. D.: Electron microscopic observations on the adrenal cortex. *Amer. J. Anat.* **97**, 409—429 (1955).
- The subendothelial space in certain endocrine tissue. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 293—296 (1956).
- Physiologically induced changes in adrenocortical mitochondria. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 313—317 (1956).
- LUFT, J., and O. HECHTER: An electron microscopic correlation with function in the isolated perfused cow adrenal. Preliminary observation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 615—620 (1957).
- PALADE, G. E.: The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* **114**, 427—451 (1952).
- Studies on the endoplasmic reticulum. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 567—582 (1955).
- ROSS, M., G. D. PAPPAS, J. T. LAUMAN and J. LIND: Electron microscope observation on the endoplasmic reticulum in the human fetal adrenal. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 659—662 (1958).
- SAKAGUCHI, H., K. SUZUKI and T. YAMAGUCHI: Electron-microscopic study on Masugi's nephritis. *Trans. Soc. Path. Jap.* **45**, 402 (1956).
- SELYE, H.: On the experimental morphology of the adrenal cortex. Springfield, U.S.A.: Thomas 1950.
- SJÖSTRAND, F. S.: Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes: ultra-structure of rod-shaped mitochondria. *Nature (Lond.)* **171**, 30—32 (1953).

Prof. Dr. TAKEO YAMORI, Dr. SATORU MATSUURA and Dr. SAKAE SAKAMOTO,
Department of Pathology, Division 1, Kobe Medical College
38 Kusunoki-Cho 6-Chome, Ikuta-Ku, Kobe (Japan)

Centre d'Etudes de Physiologie nerveuse et d'Electrophysiologie du Centre national de la Recherche scientifique

RAPPORTS ONTOGÉNÉTIQUES ENTRE L'ORGANE ÉLECTRIQUE, SON INNERVATION ET SA COMMANDE ENCÉPHALIQUE (*MORMYRUS RUME*)

Par

THOMAS SZABO

Avec 4 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 8 May 1961)

Nous avons récemment apporté la preuve (1960) que les organes électriques des Mormyrides se développent à partir de plusieurs myomères caudaux. Comme la plupart des organes électriques, ceux-ci sont innervés par des neurones particuliers de la moelle épinière *b* (Fig. 1), eux-mêmes commandés par un centre encéphalique spécifique *a* (Fig. 1) de la formation réticulée bulbaire (1957 a, b, 1959).

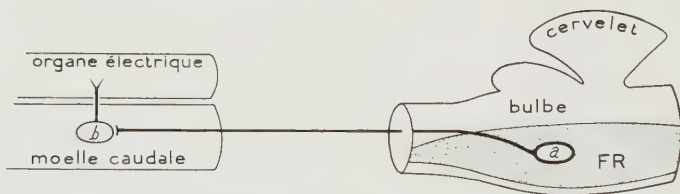


Fig. 1. Schéma montrant le dispositif nerveux spécifique de la décharge, commun à tous les poissons électriques. *a* centre de commande bulbaire (= noyau de la commande centrale,); *b* centre d'innervation spinale; FR formation réticulée

Nous avons pu suivre le développement de ces organes électriques et de leur commande nerveuse spécifique sur un lot de dix alevins de Mormyrides, reçu du Soudan grâce à l'obligeance de M. J. DAGET. Ce lot représente une série de *Mormyrus rume* (Fig. 2), dont les longueurs totales s'échelonnent de 10 à 26 mm.

Méthodes

Chaque alevin, préalablement fixé au formol à 10 %, a été coupé en deux parties (caudale et craniale), incluses ensuite à la paraffine. Les coupes, sagittales pour les parties caudales, et frontales pour les parties craniales, ont été colorées selon les méthodes usuelles histologiques: hématoxyline-éosine, Mallory et imprégnation argentique de Bodian.

Résultats

Les myomères de la région caudale de chaque spécimen (futur emplacement de l'organe électrique) ont été examinés en coupes sériées. Dans les quatre premiers échantillons de la série, dont le plus jeune (Fig. 2) possède déjà un tube digestif fonctionnel, la masse vitelline étant entièrement résorbée (DAGET 1958, 1960), cette région ne montre que des fibres musculaires striées régulières, sans aucun signe particulier apparent (Fig. 3b); des fibres nerveuses parcourent ces myomères aussi bien que les autres. C'est chez le spécimen d'une longueur de

14,5 mm (No 5 de la série) qu'il apparaît dans la dernière dizaine de myomères les plus caudaux, autour des fibres les plus médianes, une légère accumulation de noyaux sarcoplasmiques, en même temps qu'un filet nerveux particulier au niveau

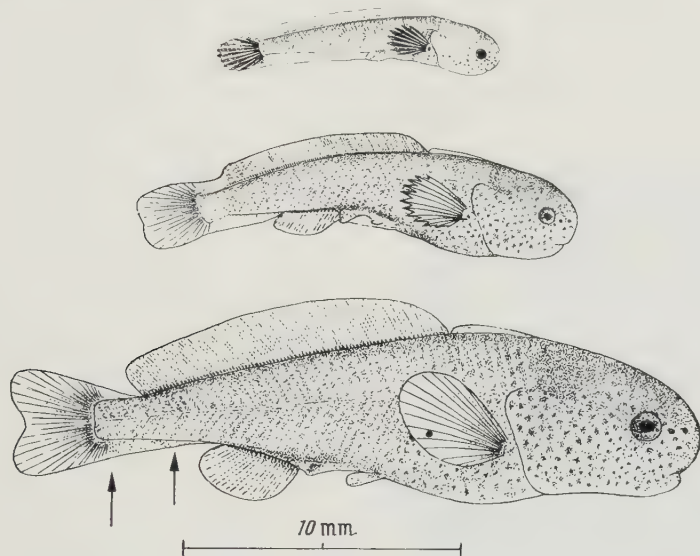


Fig. 2. Les No 1, 6 et 9 de la série de *Mormyrus rume* (cliché J. DAGET). Flèches marquant l'emplacement de l'organe électrique

de chaque myomère. L'accumulation nucléaire devient plus importante et concerne un plus grand nombre de fibres des mêmes myomères dans les spécimens plus longs d'au moins 16 mm (Fig. 4a), puis nous assistons à la transfor-



Fig. 3a et b. Schéma d'une coupe transversale du bulbe du *Mormyrus rume* No 1. L.L. lobe latéral; F.L.m. faisceaux long. méd; M. fibres de Mauthner; NCC centre de commande bulbaire (a dans la figure 1). b Coupe longitudinale des fibres musculaires intactes de la queue du même Mormyre. Haem. — eos. Trait, 100 μ

mation complète de ces fibres musculaires en électroplaques. Cette transformation paraît relativement rapide, car nous trouvons déjà en miniature, chez l'animal de 24,5 mm de long (No 9 de la série, Fig. 4b) le nombre total d'électroplaques du spécimen adulte.

Le moment exact de la différenciation du centre d'innervation spinale *b* (Fig. 1) est difficile à déterminer; néanmoins, on distingue des éléments particuliers dans la moelle dorsale chez un alevin de 13 mm; leur neurite joint rapidement les fibres musculaires prédestinées, qui fonctionnent déjà en tant qu'électroplaques tout au début de leur transformation (obs. non publ.).

En ce qui concerne le centre de commande spécifique *a* (Fig. 1) situé dans la formation réticulée bulbaire au niveau des noyaux du VIII^e nerf cranien, ses neurones sont déjà bien reconnaissables dans le bulbe d'un spécimen de 10 mm

de long (No 1 de la série, Fig. 3a); leurs neurites ont atteint sans aucun doute la moelle caudale dans un spécimen de 12,5 mm.

Nous pouvons résumer nos observations en affirmant que le développement de l'organe électrique de *Mormyrus rume* est postembryonnaire, débutant à un stade évolutif où l'animal a déjà acquis à peu près son aspect extérieur définitif et où il est capable de se déplacer pour chercher sa nourriture (DAGET). L'âge de nos alevins nous est cependant inconnu; mais si nous comparons l'aspect extérieur de l'embryon de *Hyperopisus bebe*, âgé de cinq jours décrit par JOHNELS 1954 (masse vitelline volumineuse, oeil à peine visible, nageoire pectorale très peu développée, et caudale pas encore ébauchée) avec notre plus jeune alevin (Fig. 2, en haut), nous devons estimer l'âge de ce dernier à au moins 15 jours. Les premiers signes de transformation musculaire débuteraient ainsi vers le 20^{ème} jour postembryonnaire.

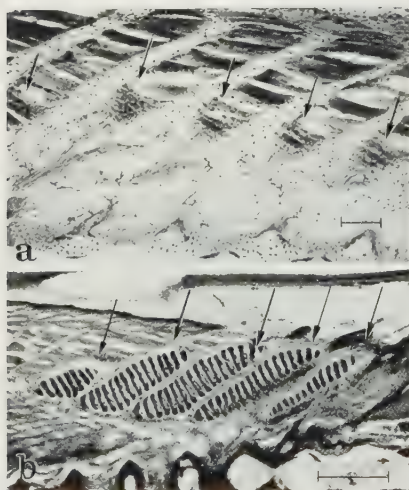


Fig. 4. a Coupe longitudinale dans la queue du *Mormyrus rume* No 6. Les flèches indiquent les parties médianes des myomères où l'accumulation des noyaux sarcoplasmiques est visible. Trait, 50 μ . Impregn. argn. Bodian. b Coupe longitudinale dans la queue du *Mormyrus rume* No 9. Notez le rangement myomérique des électroplaques (flèches).

Haem.-eos. Trait, 100 μ

Ceci représente une différenciation assez tardive en comparaison avec la différenciation de l'organe électrique du *Gymnarchus niloticus* (famille de Mormyridés) chez lequel, à l'âge de 12 jours, la masse vitelline est grande encore à un stade d'évolution avancé de l'organe électrique (DAHLGREN 1914). Notons également qu'un Maloptéreur électrique de 11 mm de long possède déjà son organe électrique pleinement développé (JOHNELS 1956).

Si la différenciation de l'organe électrique est relativement tardive, celle de la commande bulbaire est très précoce, s'accomplissant probablement au stade embryonnaire. Elle est ainsi certainement indépendante de celle de l'organe électrique, mais elle pourrait être induite, en partie tout au moins, par l'impact afférent au centre bulbaire, qui déterminerait l'excroissance de ses neurites (cf. STEFANELLI 1951). Remarquons toutefois que ces afférences sont d'origine centrale (mésencéphalique) et non périphérique (SZABO 1959).

Le centre spinal apparaît à une époque intermédiaire, antérieurement aux organes et postérieurement au centre bulbaire. Cet ordre chronologique suggère

non seulement l'induction nerveuse de l'organe, mais encore, issue du centre bulbaire, une induction du centre spinal. Le fait que le développement de l'organe électrique ne prend toute son ampleur qu'après la jonction du nerf à l'organe vient évidemment à l'appui d'une hypothèse d'induction.

Résumé

1. L'organe électrique de *Mormyrus rume* se développe à partir des fibres musculaires striées des myomères caudaux.
2. L'époque de cette transformation du tissu musculaire débute vers le 20^{ème} jour postembryonnaire, c'est-à-dire chez des alevins ayant une longueur totale de 14,5 mm environ.
3. Le centre d'innervation bulbaire, déjà présent sur notre plus jeune échantillon (10 mm), se forme vraisemblablement au stade embryonnaire, tandis que la différenciation du centre spinal précéderait immédiatement celle de l'organe électrique.
4. Venant du centre bulbaire, une induction nerveuse sur le centre spinal puis sur l'organe électrique (inductions en chaîne) est à envisager.

Bibliographie

- DAGET, J.: Alevins de *Mormyrus rume* C. et V. Bull. Soc. zool. France **83**, 200—204 (1958).
- , et F. D'AUBENTON: Morphologie du chondocrâne de *Mormyrus rume* C. et V. Bull. I. F. A. N. A **22**, 64 (1960).
- DAHLGREN, U.: Origin of the electric tissues of *Gymnarchus niloticus*. Carnegie publ. No 182 to 183, 161—194 (1914).
- JOHNELS, A. G.: Notes on fishes from the Gambia river. Ark. Zool. **6**, 327—411 (1954).
- On the origin of the electric organ in *Malapterurus electricus*. Quart. J. micr. Sci. **97**, 455—464 (1956).
- STEFANELLI, A.: The Mauthnerian apparatus in the *Ichtyopsida*; its nature and function and correlated problems of neurohistogenesis. Quart. Rev. Biol. **26**, 17—34 (1951).
- SZABO, TH.: Anatomo-physiologie comparée de divers organes électriques et de leurs centres nerveux de commande. Thèse, Paris, (1957 a).
- Les noyaux de commande centrale des organes électriques comme exemple de centres réticulés bulbaires dans un rôle reflexogène rapide. J. Physiol. (Paris) **49**, 389—390 (1957b).
- Structure intime de l'organe électrique de trois Mormyrides. Z. Zellforsch. **49**, 33—45 (1958).
- Anatomo-physiologie des centres nerveux spécifiques de quelques organes électriques. Bioelectrogenesis Proceedings of the Symposium on Comparative Bioelectrogenesis. Amsterdam: Elsevier Publ. Co. 1961.
- Some observations on the development of the electric organ of Mormyrides. Nature (Lond.) **188**, 760 (1960).

Dr. THOMAS SZABO,

4. Avenue, Gordon-Bennett, Paris XVI

Aus dem Histologischen und Embryologischen Institut der Medizinischen Fakultät Yikei-Kai
zu Tokyo, Japan (Direktor: Prof. Dr. F. YOSHIMURA)

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIE AN DEN KRISTALLOIDEN IN DER SCHILDDRÜSENZELLE

Von

F. YOSHIMURA und M. IRIE

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Februar 1961)

Das Vorkommen von Kristallen in den Schilddrüsenzellen des Opossums wurde zwar von BENSLEY (1914) und BARGMANN (1939) beschrieben, doch wurden diese charakteristischen Gebilde seither wenig beachtet. Nach BENSLEY enthält das Schilddrüsenepithel von *Didelphys* außer dem gewöhnlichen Typ von Epithelzellen eiförmige Zellen, die mit feinen eosinophilen Granula gefüllt sind; in diesen ovoiden Elementen finden sich zuweilen große nadelförmige Kristalle. BENSLEY prüfte die Frage, ob ihr Vorkommen mit dem Winterschlaf zusammenhängt. Es zeigte sich indessen, daß dies nicht der Fall ist.

In der vorliegenden Studie wird dargestellt, daß die Kristalloide auch in den Schilddrüsenzellen von *Hühnchen* und *Ratten* unter normalen und experimentellen Bedingungen auftreten; ihre submikroskopische Struktur wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskopes untersucht.

Material und Methode

Die Schilddrüsen von 155 männlichen *Ratten* (Wistar, Gewicht 120—130 g) und 100 *Hühnchen* (5. Tag nach dem Schlüpfen) wurden histologisch untersucht. Die Kristalloide in den Schilddrüsenzellen treten unter normalen Umständen nur selten auf. Daher wurde geprüft, ob es unter bestimmten Bedingungen zu einer Vermehrung dieser Zellschlüsse kommt. Aus diesem Grunde wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Tägliche Fütterung normaler *Ratten* mit 2 cm³ „thyreotrophin releasing factor“ (TRF) nach SHIBUSAWA u. a. (1956) und zwar für die Dauer von 7—14 Tagen.
2. Einmalige Injektion von Thyreotropem Hormon (Schering, Pretiron, Lot Geef. 0218; 20 Meerschweinchen-Einheiten für normale *Ratten*, eine Einheit für normale *Hühnchen*).
3. Mehrmalige Verfütterung von 0,5, 2,5 und 5,0 I.U. Oxytocin enthaltendem Hinterlappenextrakt (Teikoku Hormone and Co., Atonin-0) an *Ratten*.
4. Verfütterung von Vasopressin (Teikoku Hormone and Co.), 5,0 I.U. pro Tag an normale *Ratten*.
5. Perorale Verabfolgung an *Ratten* von 2-Methyl-2-n-Propyl-1,3-Propanediol Dikarbat, Meprobamat (Daiichi Seiyaku and Co., Atraxin) und zwar 4 mg/100 g während 14 Tagen.

Die Schilddrüsen wurden mit Levischer Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Schnittdicke 3–4 μ . Feulgen-Reaktion, Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PJS). Nachfärbung mit Eisenhämatoxylin (M. HEIDENHAIN), Azanfärbung.

Das Material für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde mit 1% Osmiumsäure-Puffer-Lösung (Mischung 1:1 von Veronal-Puffer-Lösung in pH 7,3—7,4 und 2% Osmiumsäurelösung) während 1—3 Std fixiert, in Methylalkohol entwässert und in einer Mischung von 85% n-Butyl-Methacrylat und 15% Methylmethacrylat eingebettet. Polymerisation mit 2% Benzoyl-Peroxyd als Katalysator. Anfertigen von Dünnschnitten mit dem Porter-Blum-Mikrotom. Aufnahmen: Typ J.E.M. 4 C. Elektronenmikroskopische Vergrößerungen 2—10 \times .

Befunde

1. Lichtmikroskopische Beobachtung. *a) Normale Hühnchen und Ratten.* In der Schilddrüse des normalen *Hühnchens* kommen Kristalloide nicht in jeder Zelle vor (Abb. 1). Sie werden in verschiedenen Anteilen des Zelleibes beobachtet, hauptsächlich in der supranucleären Zone; sie durchsetzen das Cytoplasma in vertikaler, schräger und querer Orientierung. Auch können sie in Fadenform abgelagert werden. Nach unseren Feststellungen ist die Zahl von dicken oder langen Kristalloiden beim Hühnchen unerheblich geringer als bei der Ratte.

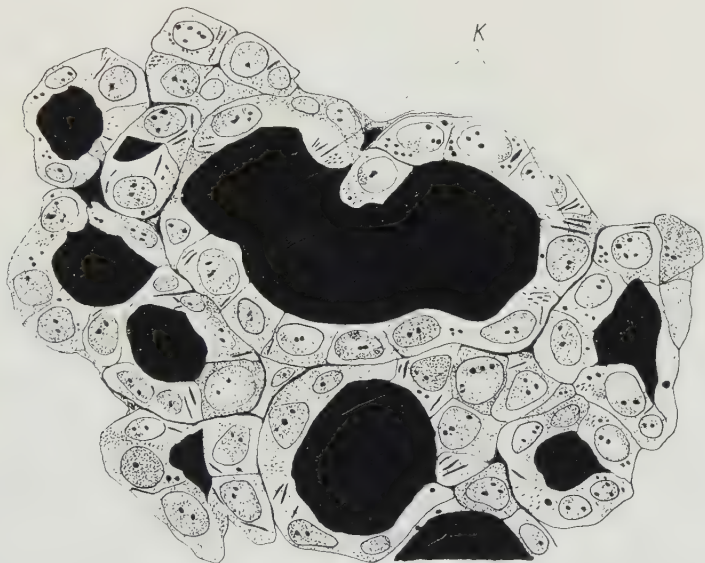


Abb. 1. Hühnchen-Schilddrüse am 5. Tag nach dem Schlüpfen. In den Follikelepithelzellen nur wenige Kristalloide (K) (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 1500 fach)

Die Kristalloide färben sich stets intensiv mit Eisenhämatoxylin und mit Azocarmin. Nach Behandlung mit Feulgens Reagens zeigen sie unter Umständen eine starke Färbung. Ihr färberisches Verhalten bei der PJS-Reaktion ähnelt dem der Kolloidtröpfchen.

Bei der normalen *Ratte* sind die Kristalloide, die sich auch mit Eosin färben, dicker und länger als beim Hühnchen (Abb. 2); nach Lokalisation und Form verhalten sie sich gleichartig. Das längste von uns beobachtete Kristalloid hatte eine Länge von $6,0-7,0\ \mu$; sein Durchmesser entsprach dem eines gewöhnlichen kleinen Kolloidtröpfchens ($0,5-2,0\ \mu$). Die Querschnitte der Kristalloide sehen aus wie Sphäroide.

b) Versuchstiere. Während Zahl und Größe der Kristalloide bei der *Ratte* nach Zufuhr von TSH im allgemeinen zunehmen, ist dies beim *Hühnchen* nur in recht beschränktem Umfange der Fall. Besonders 24—36 Std nach Hormonzufuhr weisen die Schilddrüsenzellen der *Ratte* häufig längere und dickere Kristalloide in größerer Zahl auf (Abb. 3).

Während 7tägige Fütterung mit $0,5\ \text{I.U.}$ Vasopressin einen Schwund der Kristalloide in den atrophischen Zellen der Schilddrüse der Ratte zur Folge hat, bringt

eine Fütterung mit 2,5 I.U. des Hormons eine Hypertrophie der Zellen hervor, die nunmehr zahlreiche Kristalloide enthalten (Abb. 4). Die Fütterung mit geringen Dosen von Oxytocin bewirkt eine nur leichte Vermehrung der Kristalloide. Injektion von 2,5 und 5,0 I.U. dagegen eine massenhafte Ablagerung (Abb. 5).

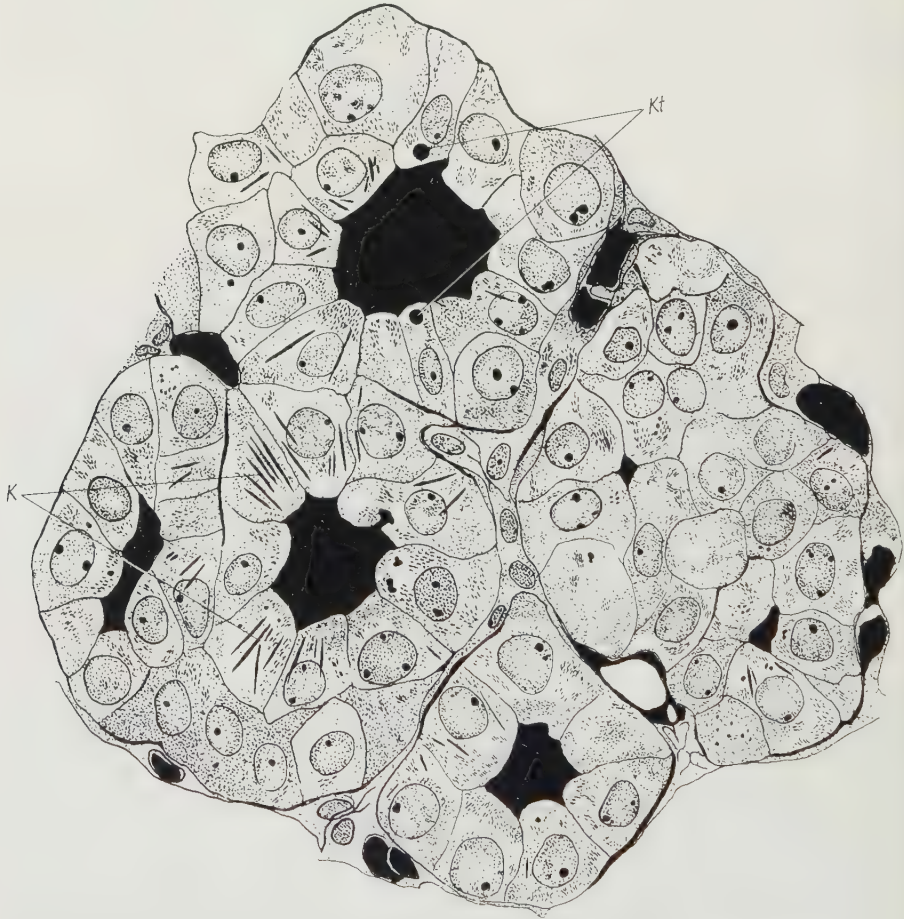


Abb. 2. Rattenschilddrüse, deren Epithelzellen Kristalloide (K) und Kolloidtröpfchen (Kt) enthalten (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 1500fach)

In Fällen, in denen ungereinigter Hinterlappenextrakt täglich während 14 Tagen eingespritzt wurde, erschienen die Kristalloide gleichfalls häufig; dies trifft auch für diejenigen Tiere zu, denen Dosen von 2,5 und 5,0 I.U. verabfolgt wurden. Bei 30tägiger Fütterung vermindert sich dagegen die Zahl der Kristalloide. Gaben von Dicarbamat bewirken eine sichere Vermehrung der Kristalloide im gleichen oder noch höherem Maße als sie nach Applikation von Oxytocin (Abb. 6) festzustellen ist.

Einer 7—14tägigen Fütterung mit 2 cm³ von TRF folgt eine deutliche Neubildung von Schilddrüsenfollikeln (Abb. 7), doch kommt es nur zu einer leichten Vermehrung der Kristalloide. Sie ist jedoch viel geringer als diejenige, die man

nach Zufuhr von Hinterlappenhormonen und Dikarbamat beobachtet. Nach unseren Beobachtungen gibt es keine Veränderungen des Volumens der Kristalloide.

Die oben erwähnten Hormone, welche die Schilddrüsenzelle direkt oder indirekt beeinflussen, bewirken eine deutliche Zunahme der Länge und Zahl der

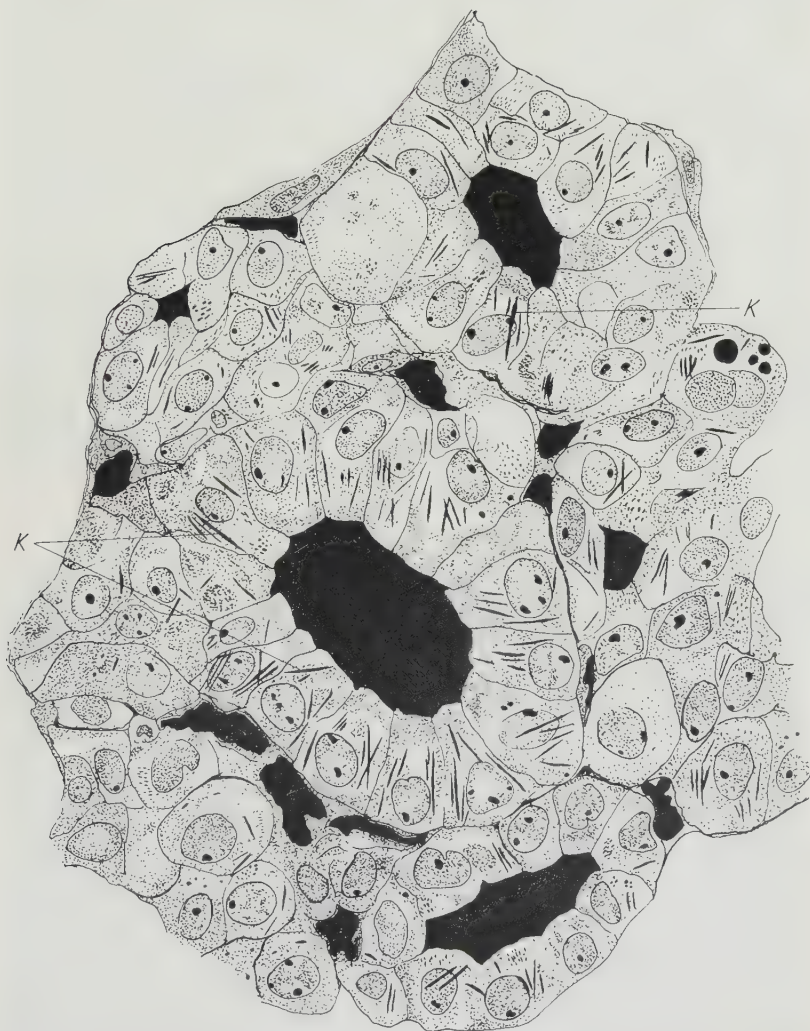


Abb. 3. 36 Std nach einmaliger Injektion von 20 Meerschweinchen-Einheiten TSH. Das Follikel-epithel enthält zahlreiche Kristalloide. (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 1500fach)

Kristalloide. Insbesondere trifft dies für jene Tiere zu, die Hinterlappenhormone erhielten. Dagegen treten Kristalloide nicht so häufig nach Injektion von Dikarbamat und TRF auf. TSH bewirkt eine leichte Kristallvermehrung.

2. Elektronenmikroskopische Beobachtungen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen zunächst die lichtmikroskopischen Feststellungen bezüglich der Lokalisation und Größe der Kristalloide in der normalen Thyreoidea-Zelle

der *Ratte*. Die Einschlüsse werden verständlicherweise meistens im Quer- oder Schrägschnitt, selten im Längsschnitt erfaßt (Abb. 8). Die lichtmikroskopisch gut

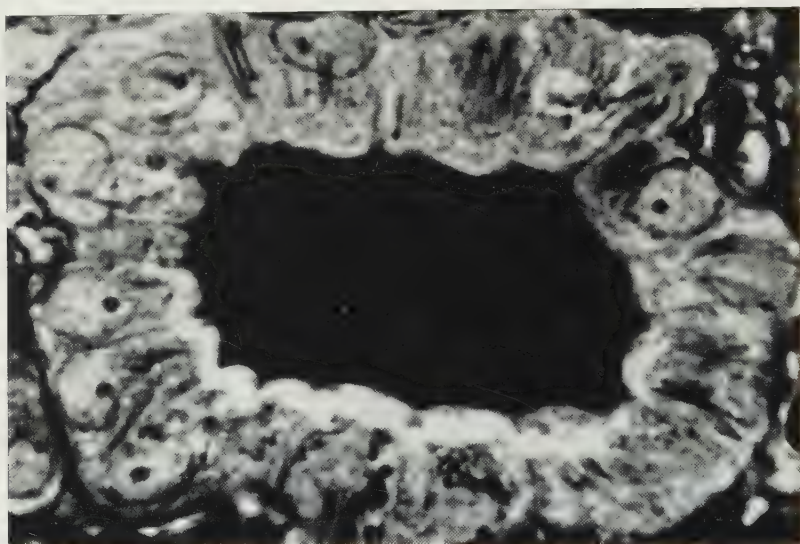


Abb. 4. Schilddrüse einer Ratte, die täglich einmal, 7 Tage lang, eine Injektion von 2,5 I.U. Vasopressin erhalten hat. Angeschwollene Epithelzellen mit zahlreichen Kristalloiden. (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 1000fach)

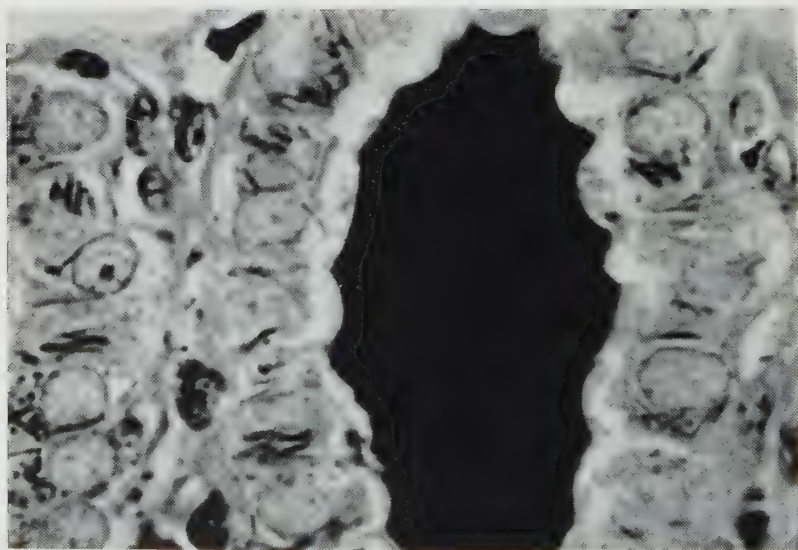


Abb. 5. Schilddrüsenfollikel einer Ratte nach Einspritzung von 2,5 I.U. Oxytocin, täglich einmal, 14 Tage lang. Die Kristalloide sind auffallend vermehrt. (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 900fach)

erkennbaren Kristalloide in den Schilddrüsenzellen des *Hühnchens* konnten wegen ihrer geringen Zahl von uns elektronenmikroskopisch nicht erfaßt werden.

Die Kristalloide bestehen aus einer dichten *Zentralsubstanz* und einer umgrenzenden *Membran* (40—50 Å). Zwischen beiden befindet sich eine helle Zone



Abb. 6. Schilddrüse der Ratte. Einmalige Injektion von Dikarbamat 4 mg/100 g. Die Epithelzellen sind nicht angeschwollen, enthalten jedoch zahlreiche Kristalloide (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 1500fach)

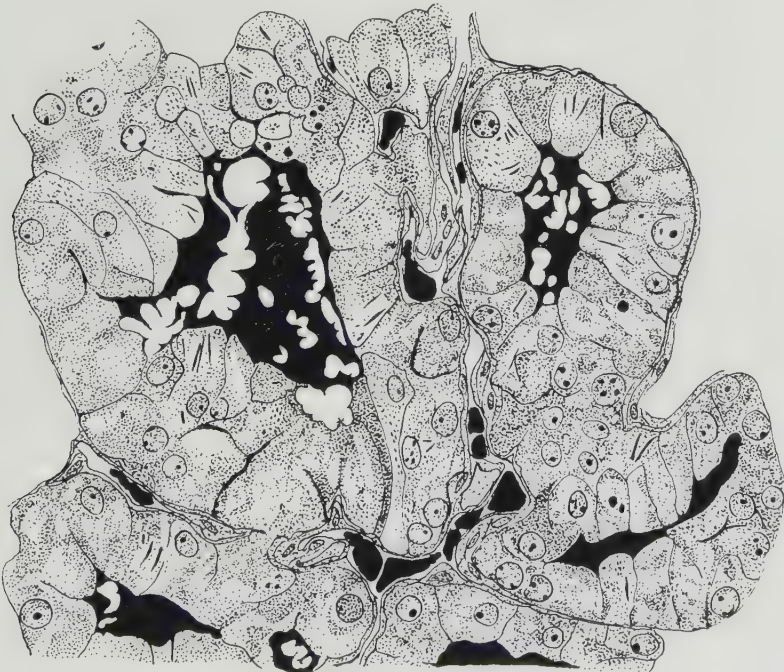


Abb. 7. Schilddrüse der Ratte. Nach Injektion von 2 cm³ TRF-Lösung während 7 Tagen. Follikel epithel geschwollen, nur wenig Kolloid (LEVI, PJS-Eisenhämatoxylin, Vergr. 900fach)

(Breite 30—84 m μ , Abb. 8). Die dichte Zentralsubstanz besitzt keine streifige Struktur. Auf Querschnitten erscheint die Membran wie ein Beutel, der kantige Körper (Rhomboeder usw.) enthält. Letztere liegen einzeln oder in Gruppen

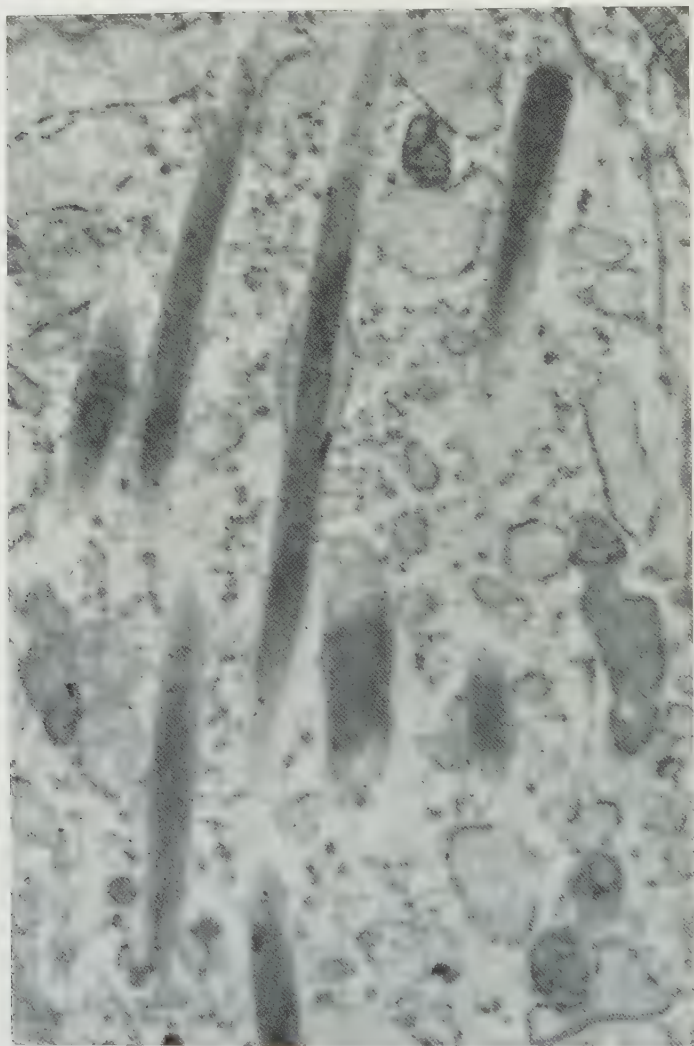


Abb. 8. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Kristalloiden in einer Schilddrüsenzelle der Ratte. Eine Membran umgibt die Zentralsubstanz, dazwischen eine helle Zone. (Vergr. 15000fach)

von 2—4 Exemplaren (Abb. 13) innerhalb des von der Membran gebildeten Sackes.

In den Thyreoideazellen von *Hühnchen*, die TSH erhalten hatten, kommt es zur Anreicherung von Kristalloiden besonders 6, 18, 24 und 36 Std nach der Injektion (Abb. 9, 10). Das Elektronenmikroskop läßt keine entscheidenden qualitativen Unterschiede der Kristalloide unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erkennen. Immerhin haben wir den Eindruck, daß die helle Zone

nach Injektion von TSH in der Regel erweitert (Abb. 10) ist. Hier und da liegt die Hülle der Zentralsubstanz eng an (Abb. 9). Diese enthält manchmal schräg orientierte, längliche Splitterchen. Für wichtig halten wir folgende Beobachtung:

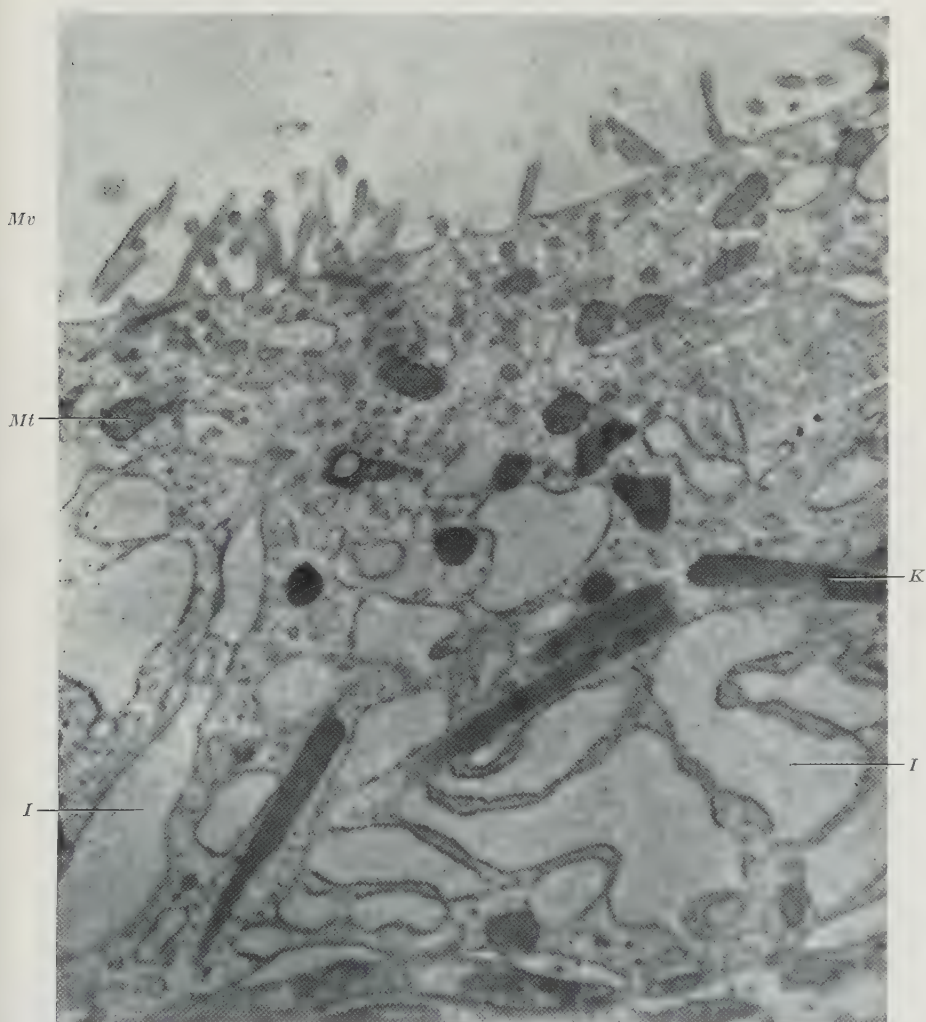


Abb. 9. Ausschnitt aus einer Schilddrüsenzelle des Hühnchens, 18 Std nach der Injektion von 1 Meer-schweinchen-Einheit TSH. Längsgetroffene Kristalloide (K) im basalen Zellabschnitt. I Intracelluläres Kolloid; Mv Mikrovilli; Mt Mitochondrien. (Vergr. 10000fach)

Die Hüllen der Kristalloide setzen sich in die Membranen des endoplasmatischen Reticulums fort, dessen Zysternen eine massendichte Substanz enthalten. Es besteht also eine enge Beziehung zwischen den Kristalloiden und dem endoplasmatischen Reticulum.

Bei den *Ratten*, die nur einmal TSH erhalten hatten, konnten wir nicht entscheiden, ob die Veränderungen der Kristalloide ihre Dichte betreffen oder nicht. Kristalloide findet man vor allem 1, 3, 6, 18 und 24 Std nach der TSH-Gabe

(Abb. 11); ihre Vermehrung ist um so ausgesprochener, je längere Zeit seit der Injektion verstrichen ist. Die charakteristischen Veränderungen an den Kristal-



Abb. 10. Längsschnitt durch Kristalloide in einer Schilddrüsenzelle vom Hühnchen, 6 Std nach einmaliger Einspritzung von 1 Meerschweinchen-Einheit TSH. Beachte die Hülle und Zentralsubstanz der Kristalloide. *G* großes Granulum, *Er* endoplasmatisches Reticulum, *K* Kolloid, *Mt* Mitochondrium

loiden sind folgende: Die dichte Zentralsubstanz nimmt nicht immer den ganzen Raum des Kristalloidbeutels ein, vielmehr kann eine gewisse Zahl großer stabförmiger Körper in dem Sack eingeschlossen sein (Abb. 12). Wie bei den Hühn-

chen, so ist auch bei den Ratten die Zentralsubstanz in längs und schräg orientierte Splitterchen aufgeteilt. Die zwischen diesen befindliche helle Zone scheint



Abb. 11. Zwei benachbarte Schilddrüsenzellen einer Ratte, 6 Std nach Injektion von 20 Meerschweinchen-Einheiten TSH. Die Zellen enthalten zahlreiche dichte große Körnchen und Kristalloide. Beachte Kolloid im Zytoplasma. *BM* Basalmembran; *G* Golgi-Apparat; *DK* dichte große Körnchen. (Vergr. 12000fach)

aus geringen Mengen dichter Substanz zu bestehen, aus der sich möglicherweise die Kristalloide bilden. Entsprechende Befunde wurden häufig in den Experimenten an Ratten, denen man TSH eingegeben hatte, erhoben. Der Beutel

(Abb. 13) ist sicherlich nichts anderes als ein Abschnitt des Reticulums, in welchem dichte Substanz abgelagert wird. Eine örtliche Beziehung der Kristalloide zum Golgi-Apparat konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

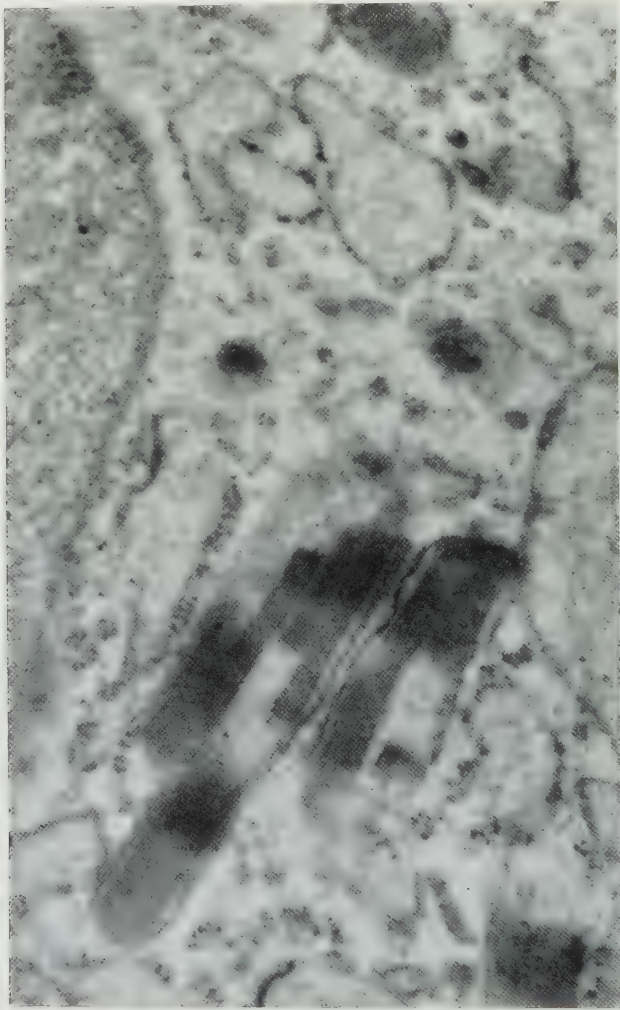


Abb. 12. Schrägschnitt der Kristalloide in einer Schilddrüsenzelle. Ratte. 1 Std nach der Injektion von 20 Meerschweinchen-Einheiten TSH. Im Beutel der Kristalloide befindet sich dichte Zentralsubstanz mit verschiedenen Formen. (Vergr. 30 000fach)

Wie bei der lichtmikroskopischen, so gewinnt man bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung den Eindruck, daß die Verabfolgung von TSH zu stärkerer Vermehrung der Kristalloide führt als die Zufuhr anderer Hormone. Die morphologischen Veränderungen der Kristalloide nach Applikation von Hinterlappenhormonen und Dikarbamat erstrecken sich auf folgende Phänomene: Verlängerung der Kristalloide, Einengung der zwischen der dichten Zentralsubstanz und der Membran befindlichen Zone, verstärkte Zunahme der kleinsten Partikel (Abb. 14), die als elementare Bestandteile der dichten Zentralsubstanz gelten können.

Wir haben in den supranukleären Anteilen der Schilddrüsenzelle von Ratten, denen TSH verabfolgt worden war, große Granula mit einem Durchmesser von

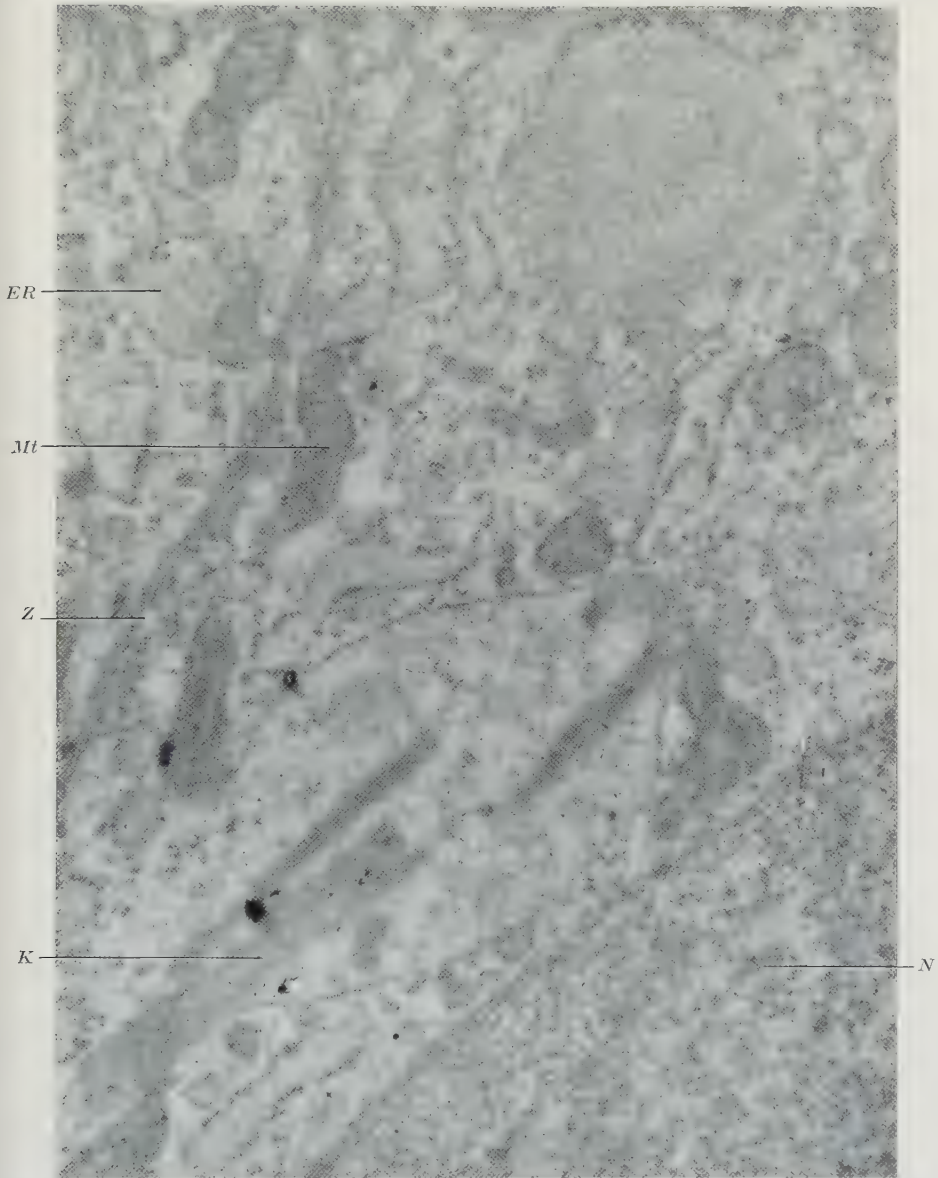


Abb. 13. Schilddrüsenzelle der Ratte, erweiterter „Beutel“ der Kristalloide (*K*), der mit dem endoplasmatischen Reticulum zusammenhängt, 3 Std nach Einspritzung von 20 Meerschweinchen-Einheiten TSH (Vergr. 35000fach). *ER* Ergastoplasmatisches Reticulum; *K* Kristall; *Mt* Mitochondrium; *N* Nucleus; *Z* Zellmembran

0,22—1,8 μ und mit einer 50 Å dicken Membran gefunden. Diese mögen dem Typ des großen Granulums von EKHOLM und SJÖSTRAND (1957) entsprechen. Die Substanz der Granula besteht aus feinen Partikeln. Außerdem konnten wir gelegentlich kleine dichte Granula mit einem Durchmesser von 500—2000 Å

feststellen, die eine homogene Substanz von verschiedener Dichte enthalten. Ihr Querschnittsbild ist in mancher Hinsicht dem der Kristalloide ähnlich (Abb. 15).

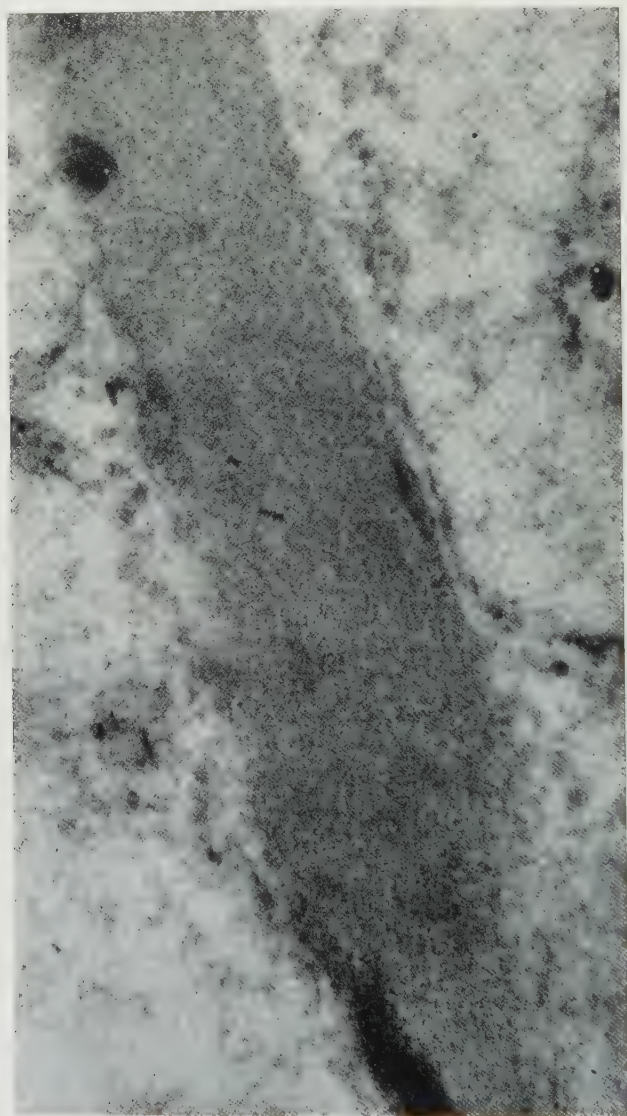


Abb. 14. Ausschnitt aus einer Schilddrüsenzelle der Ratte mit Kristalloid, Injektion von Dikarbamat 4 mg/125 g täglich während 14 Tagen. Weder Gitter- noch Streifenstruktur des Kristalloids. (Vergr. 112000fach)

Zusammenfassung

1. Die in den Schilddrüsenzellen männlicher *Hühnchen* und *Ratten* vorkommenden Kristalloide wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Es handelt sich um 6—7 μ lange, stäbchen- und fadenförmige Gebilde, die verschieden ausgerichtet sein können. Die Kristalloide, die sich mit Eisenhämato-

xylin nach HEIDENHAIN stark anfärben, geben eine intensive Perjodsäure-Schiff-Reaktion.

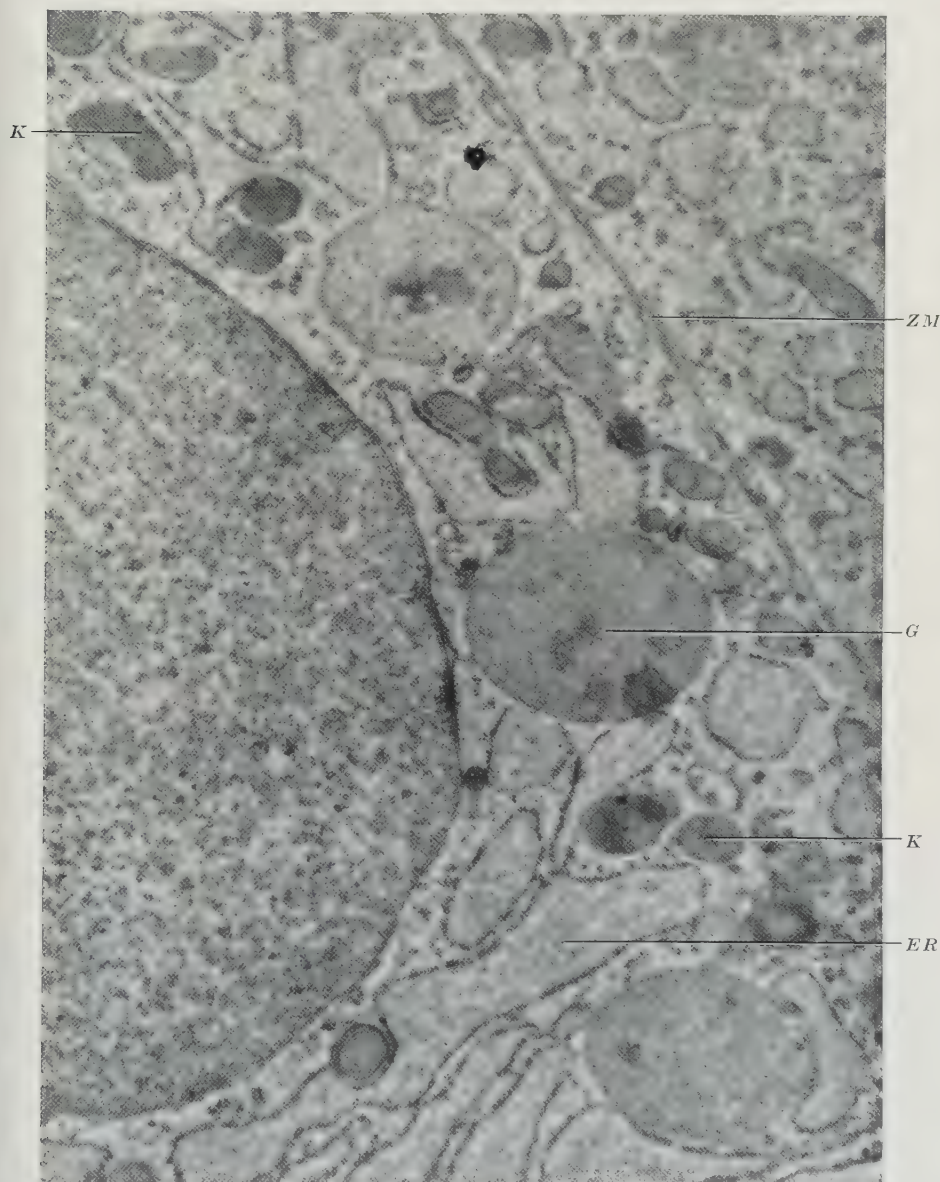


Abb. 15. Schilddrüsenzelle der Ratte 1 Std nach Injektion von 20 Meerschweinchen-Einheiten TSH.
G Große Granula im Cytoplasma; *K* kleine dichte Körnchen; *ER* endoplasmatisches Reticulum;
ZM Zellmembran. (Vergr. 18 000fach)

Die Kristalloide dürften eine Abart der großen Granula sein, die Kolloidtröpfchen darstellen. Man kann annehmen, daß die Kristalloide aus der dichten Substanz innerhalb jener „Säcke“ herrühren, die als Abschnitte des endoplasmatischen Reticulums anzusehen sind.

2. Wie die elektronenmikroskopische Untersuchung ergibt, bestehen die Kristalloide aus einer dichten Zentralsubstanz und einer Hülle. Zwischen beiden befindet sich eine mehr oder weniger dichte „helle“ Zone. Die Zentralsubstanz ist aus feinsten elektronendichten Partikeln gefügt.

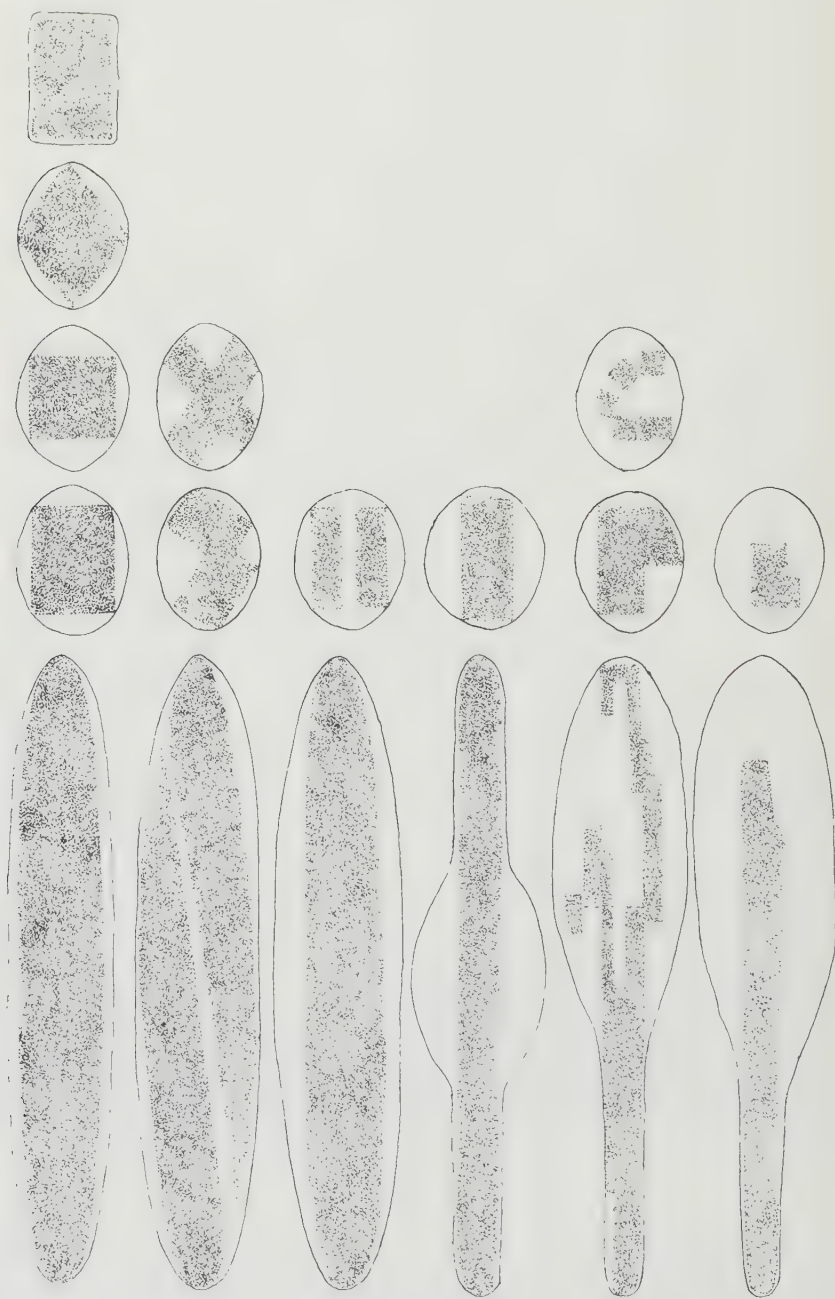


Abb. 16. Schematische Darstellung der verschiedenen Formen der Kristalloide im Längs- und Querschnitt

3. Nach einmaliger oder wiederholter Zufuhr von die Schilddrüse stimulierenden Stoffen (TSH, TRF von SHIBUSAWA, Vasopressin, Oxytocin, roher Hinterlappenextrakt, Dikarbamat) vermehren sich die Kristalloide deutlich. Die stärkste Kristalloidvermehrung wurde nach Verabfolgung von Oxytocin, rohem Hinterlappenextrakt und Dikarbamat beobachtet.

4. Eine deutliche Veränderung der Ultrastruktur der Kristalloide unter dem Einfluß von Hormonen konnte nicht regelmäßig festgestellt werden. Nach Zufuhr von Dikarbamat verschwindet nach unseren Beobachtungen die helle Zwischenzone.

Literatur

- BARGMANN, W.: Die Schilddrüse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. VI/2, herausg. von W. v. MÖLLENDORFF. Berlin: Springer 1939.
BENSLEY, R. R.: The thyroid gland of the opossum. Anat. Rec. 8, 431—443 (1914).
EKHOLM, R., and F. S. SJÖSTRAND: The ultrastructural organization of the mouse thyroid gland. J. ultrastruct. Res. 1, 178—199 (1957).

Professor Dr. FUJIO YOSHIMURA,
Department of Histology and Embryology Jikei-Kai
School of Medicine, Minato-Ku, Tokyo, Japan

Aus dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin,
dem Rudolf-Virchow-Haus der Charité (Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER)

ZUR MORPHOLOGIE DER LEBERZELLMEMBRAN

Von

HEINZ DAVID

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Mai 1961)

Die Existenz einer Außenmembran der Zelle, im besonderen der Leberzelle, schien lange Zeit keineswegs gesichert (ARNOLD 1908). Erst die elektronenmikroskopische Untersuchungsmethode hat zur eindeutigen Definition dieses Zellbestandteils geführt. Im Verlaufe unserer Untersuchungen an den Leberzellen verschiedener Tiere haben wir eine Vielzahl bisher noch nicht bekannter Struktureigentümlichkeiten an dieser Membran beobachten können. Die Leberzellmembran und die von ihr abhängigen Bildungen sind in vielen Fällen so charakteristisch, daß ihre Besonderheiten eine Zuordnung der einzelnen Leberzelle zu einer Tierart gestatten.

A. Material und Methode

Untersucht wurde Lebergewebe von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Goldhamstern, Kaninchen, Tauben und Goldfischen unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen. Nach Fixierung in isotonischer, gepufferter OsO_4 -Lösung, die je nach Tierart in unterschiedlicher Weise hergestellt wurde, erfolgte die Einbettung nach der Entwässerung in aufsteigender Azetonreihe in Vestopal W (RYTER und KELLENBERGER 1958). Herstellung der Schnitte mit Ultramikrotomen nach NIKLOWITZ. Aufnahmen mit einem elektrostatischen Elektronenmikroskop der Firma VEB Carl Zeiss-Jena — Typ D_2 — und einem elektromagnetischen Mikroskop des Werkes VEB Fernsehelektronik-Berlin — Typ SEM_3 . Lichtoptische Nachvergrößerungen.

B. Ergebnisse

I. Die Leberzellmembran im Bereich des Disséschen Raumes

Die polare Natur der Leberzelle ist nicht nur aus der Anordnung intrazellulärer Bestandteile erkennbar und aus den funktionellen Begebenheiten ersichtlich, sondern äußert sich auch in den Bildungen der Außenmembran. Diese ist im Gebiet des Disséschen Raumes durch eine große Zahl von Mikrovilli gekennzeichnet, die die Gesamtoberfläche um ein Vielfaches vergrößern, so daß die resorptiven Aufgaben erfüllt werden können. Mikrovilli finden sich nur in den Bereichen, die allein durch die schmalen lamellären Ausläufer der Sternzellen vom Sinusoid getrennt sind (Abb. 1), während sie im Gebiet der Sternzellkerne fehlen (Abb. 2). Die Länge der Mikrovilli beträgt bei der Maus und Ratte $0,25\text{--}1\mu$, ihre Dicke $400\text{--}1600\text{ \AA}$. Sie enthalten nur unstrukturierte Cytoplasmaanteile; es lassen sich keine Poren an der Oberfläche beobachten. Die Aufnahme größerer Stoffbestandteile erfolgt durch Pinocytose. Unter den verschiedenen Funktionszuständen, z. B. bei Nahrungszufuhr oder -mangel, nimmt die Zahl, Länge und Breite der Mikrovilli zu oder ab. Schon in den frühesten Stadien der postmortalen Veränderungen kommt es zu Flüssigkeitseinlagerungen in den Disséschen Raum.

So ist 1 Std post mortem infolge der passiven Dehnung der Zellmembran ein Verschwinden der Mikrovilli beim Kaninchen zu beobachten. Form und Größe der Mikrovilli weisen gewisse Unterschiede bei den einzelnen Tierarten auf. Sie

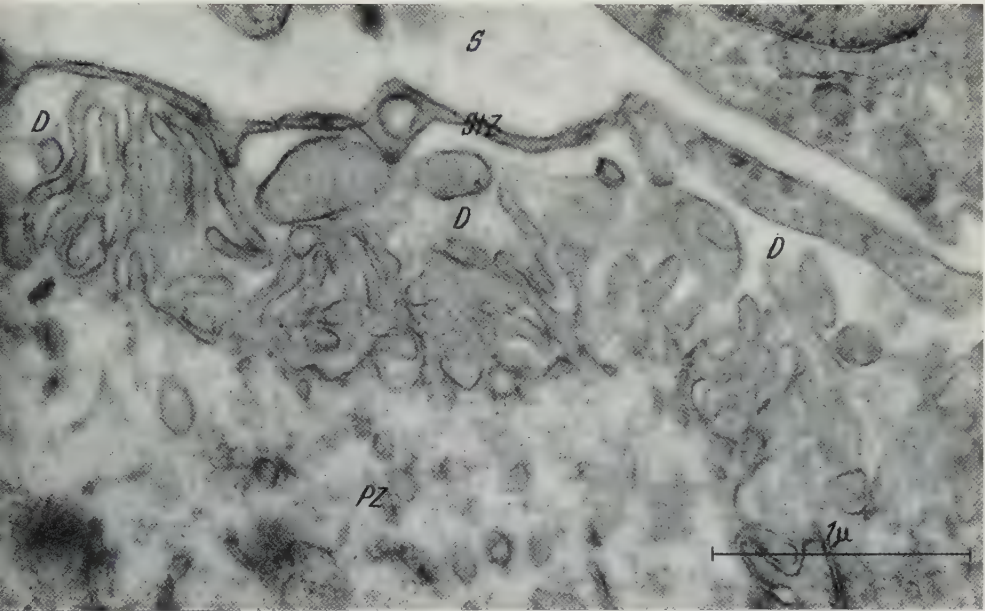


Abb. 1. Parenchymzelle (PZ) der Mäuseleber. Reichlich sinusoidale Mikrovilli im Disséschen Raum (D). Flach ausgezogener Sternzellausläufer (StZ). S Sinusoid. Aufn.-Nr. D 1286. Vergr. 12800:1. Ges.-Vergr. 38400:1

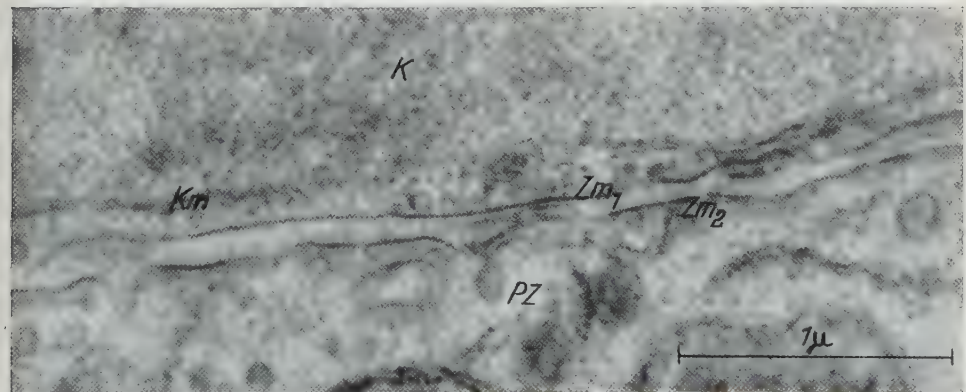


Abb. 2. Randgebiet einer Parenchymzelle der Mäuseleber. Sehr schmaler Disséscher Raum. Keine Mikrovilli. Glatte Zellwände. Zm₁ Zellmembran der Sternzelle. Zm₂ Zellmembran der Parenchymzelle (PZ). K Kern der Sternzelle mit Kernmembran (Km). Aufn.-Nr. D 144. Vergr. 7200:1. Ges.-Vergr. 36000:1

sind besonders stark bei Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Goldhamster ausgebildet, während sie bei der Taube und dem Goldfisch nur in geringer Zahl und Größe vorhanden sind. Desgleichen ragt auch der interparenchymatöse Teil des Disséschen Raumes, der ebenfalls Mikrovilli enthält, wechselnd tief zwischen die Zellen hinein.

Die Membran der Leberzellen im Gebiet des Disséschen Raumes wurde schon von anderer Seite dargestellt (WASSERMANN 1957, 1958; COSSEL 1959); hierbei sind besonders die Beziehungen zu den Sternzellen und ihren Ausläufern beachtet

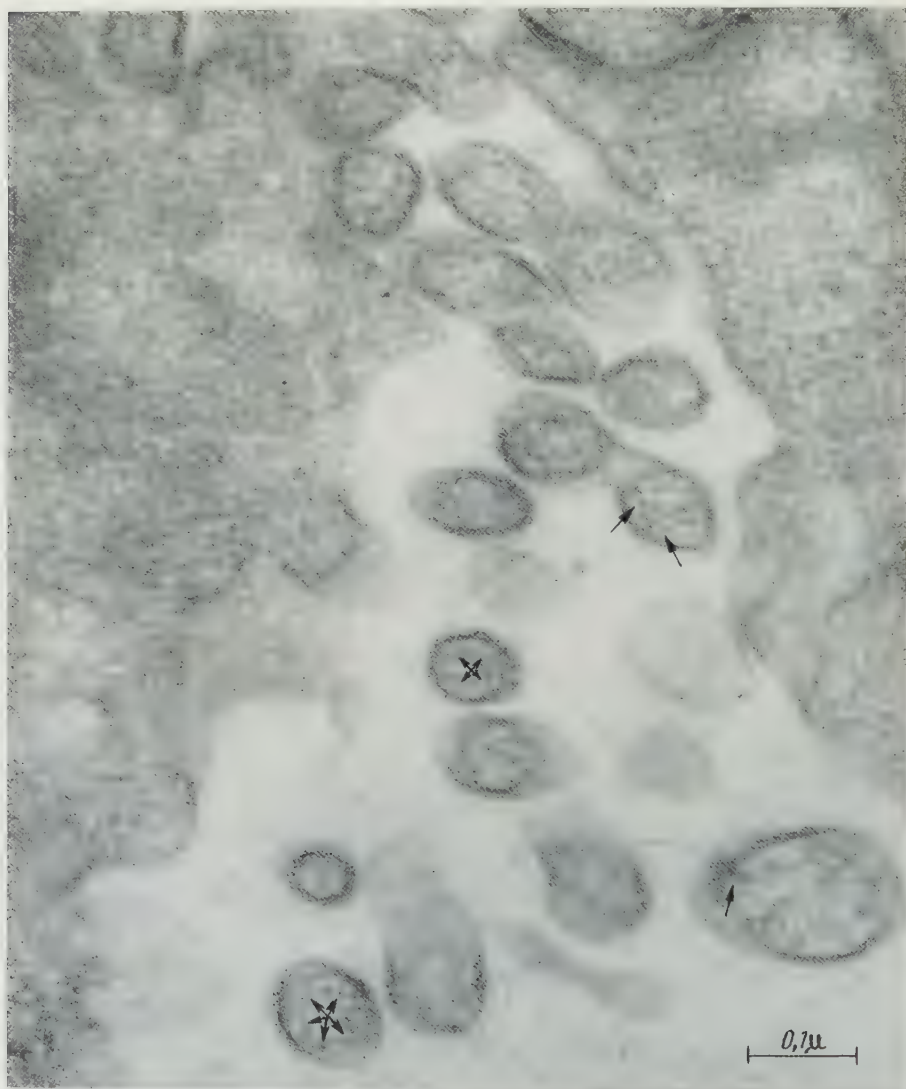


Abb. 3. Gallenkapillare der Kaninchenleber mit quergeschnittenen Mikrovilli, in denen runde bis ovale Querschnitte röhrenförmiger Innenstrukturen (X) sichtbar sind. Aus drei Schichten aufgebaute Zellaußenmembran. Aufn.-Nr. WF 221. Vergr. 15 000:1. Ges.-Vergr. 15 0000:1

worden. Die Außenmembran der Leberzelle im Bereich des perisinusoidalen Raumes soll einfach konturiert sein (RÜTTNER und VOGEL 1958); nach PARKS (1957) ist sie aber in einzelnen Anteilen aus drei Schichten aufgebaut. In den sinusoidalen Mikrovilli ist 5-Nucleotidase histochemisch nachzuweisen (NOVIKOFF und ESSNER 1960). Das Cytoplasma innerhalb der Mikrovilli und in den übrigen

Bereichen nahe der sinusoidalen Wand zeigt keine Besonderheiten oder Unterschiede gegenüber dem Grundplasma. Auch bei verschiedenen pathologischen

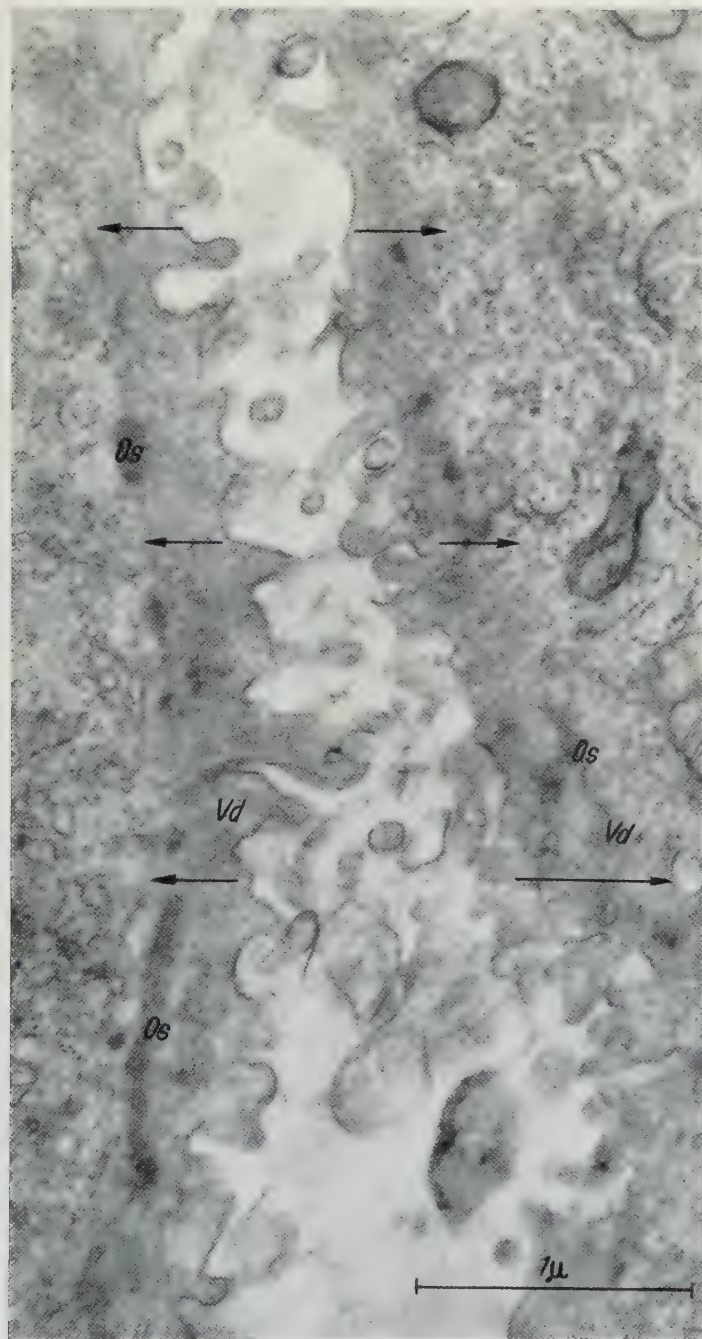


Abb. 4. Gallenkapillare der Kaninchenleber mit breiter bandartiger Verdichtung des umgebenden Grundplasmas (*Vd* →). Im Übergangsgebiet zu normalem Cytoplasma streifenförmige Osmiophilie (*Os*).
Aufn.-Vergr. D 2385. Vergr. 7200:1. Ges.-Vergr. 36000:1

Zuständen konnten wir keine Veränderungen sehen. Die von COSSEL (1959) beobachtete bandartige Verdichtung des Cytoplasmas an der sinusoidalen Zellwand bei der Virushepatitis des Menschen kann mithin als für diese Erkrankung bezeichnend angesehen werden. Diese Veränderung wird von COSSEL auf Grund des gleichen Aussehens des Cytoplasmas um die interzellulären Gallenkapillaren auf eine mögliche Gallenabgabe ins Blut zurückgeführt. Bei der Virushepatitis ist außerdem eine umschriebene Zerstörung der Zellmembran und eine Verminderung der Zahl der Mikrovilli beschrieben worden.

II. Die Leberzellmembran im Bereich der Gallenkapillaren

Wie im Gebiet des Disséschen Raumes finden wir auch im Bereich der Gallenkapillaren reichlich Mikrovilli. Jedoch ist ein Unterschied in der Struktur in vielen Fällen deutlich. Beim Kaninchen kann die Dreischichtung der Membran bewiesen werden. Erstmals haben wir hier in den Mikrovilli der Gallenkapillaren runde bis ovale Querschnitte von einer Größe von 70—90 Å und in einer Zahl von 5—7 beobachtet (Abb. 3), die wir auf im Längsschnitt sichtbare Kanälchen in den Mikrovilli zurückführen. Ihnen kommt möglicherweise eine sekretorische Funktion zu. In welcher Weise sie in das basale Grundplasma münden, kann noch nicht geklärt werden.

Das die Gallenkapillaren umgebende Cytoplasma ist homogen bandartig verdichtet und zeigt im Übergangsgebiet zum regelrecht strukturierten Cytoplasma streifenförmige osmiophile Ablagerungen (Abb. 4). Die Zahl der Mikrovilli und die Größe der Gallenkapillaren wechselt unter den verschiedenen funktionellen Bedingungen (DAVID 1960, 1961). Gallenstauung bewirkt nicht nur eine Erweiterung der Gallenkapillaren, sondern auch eine Verbreiterung der bandartigen Verdichtung. Je nach Tierart ist die Verdichtungszone unterschiedlich ausgebildet. So finden wir bei der Maus und Ratte eine feingranuläre Ablagerung in der Randzone um die Gallenkapillaren. Beim Meerschweinchen sind teils granuläre, teils aber auch schmale homogene bandartige Bildungen sichtbar. Auch beim Goldhamster sind sie nur in einer dünnen Zone ausgebildet.

Die Gallenkapillaren werden im allgemeinen bei Maus, Ratte, Meerschweinchen, Goldhamster und Kaninchen von zwei Zellen begrenzt, jedoch haben wir auch in Einzelfällen die Bildung aus den Randgebieten von drei Zellen sehen können. In der Nähe normal gebildeter Gallenkapillaren der Maus, die jedoch keine Mikrovilli besitzen, finden sich Einstülpungen, intrazelluläre Vakuolen oder Gangsysteme mit einer gleichartigen Begrenzung, ebenfalls von einer bandartigen Verdichtung umgeben (Abb. 5).

Bei der Taube ist ein ganz andersartiger Aufbau der Gallenkapillaren zu beobachten; sie werden hier von 4—5 Zellen gebildet. Der normalerweise sehr breite interzelluläre Spaltraum wird vor der Einmündung in die Gallenkapillare düsenartig eingeengt. Diese schmalen Spalten münden zwischen den Mikrovilli. Das randnahe Cytoplasma ist granulär ausgebildet.

Eindeutige Gallenkapillaren ließen sich beim Goldfisch nur selten erkennen. Im Grenzbereich von drei oder mehr Zellen ist der breite interzelluläre Spalt in einen größeren Raum umgewandelt, in dem die Gallenflüssigkeit abfließen könnte.

Die Zellbegrenzung beiderseits der Gallenkapillare ist bei den Säugetieren stark osmiophil und verdickt; das Cytoplasma zeigt in diesem Bereich Anlagerungen von weiteren kurzen Membranteilen, die als Schlußleisten zu bezeichnen sind (FAWCETT 1958, DAVIS 1960). Bei diesen Schlußleisten handelt es sich nach DAVIS um Membranen von einer Breite von 80—90 Å und einer Länge von 500—600 Å, die zu einem festen Kontakt der Zellen in diesem Bereich führen. Bei Homogenisationsversuchen können daher die Gallenkapillaren erhalten bleiben, was für eine eigenständige Membran zu sprechen

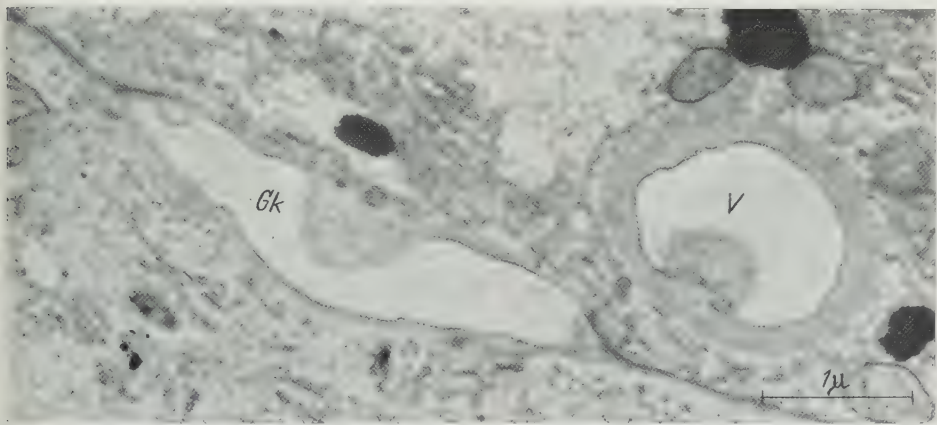


Abb. 5. Gallenkapillare aus einer Mäuseleber (GK) ohne Mikrovilli mit spärlicher bzw. fehlender Veränderung des umgebenden Cytoplasmas. Außerdem intrazelluläre Vakuolenbildung (V) (Divertikel?) mit scharfer innerer Begrenzung und breiter homogener Randzone. Aufn.-Nr. D 733. Vergr. 7200:1. Ges.-Vergr. 21600:1

scheint. Schlußleisten oder ähnliche Bildungen lassen sich bei der Taube und dem Goldfisch nicht finden.

Es muß heute als sicher gelten, daß die Gallenkapillaren keine eigenen Wänden besitzen, sondern einfache Spalträume zwischen Zellen sind (COSTA u. a. 1952; ROUILLER 1954, 1956; DAVIS 1960), in denen eine mehr oder weniger große Zahl von Mikrovilli ausgebildet ist. Nicht geklärt ist, ob sich schon im Normalzustand Verbindungen zwischen den Gallenkapillaren und der Sinusoidwand entwickeln können (EDLUND und HANZON 1953). Bei Gallenstauung scheint dies der Fall zu sein; auf diese Weise wäre der Übertritt von Galle ins Blut vorstellbar. Gallenspalten mit Ausbreitung über fast eine ganze Zellseite haben wir auch in unseren Versuchen ohne Stauung gesehen. Nach ROUILLER (1954) sind die Gallenkapillaren im Hunger kollabiert, was wir nicht in jedem Fall bestätigen konnten (DAVID 1960, 1961). Im Gegensatz zu FAWCETT (1955) bin ich der Meinung, daß auch in der Säugerleber Gallenkapillaren aus mehr als zwei Zellen aufgebaut sein können. Bei den übrigen Tieren ist diese Begrenzung durch mehrere Zellen typisch.

Ob und in welcher Weise die bandartigen Verdichtungen oder feingranulären Ablagerungen des angrenzenden Cytoplasmas mit der Abgabe der Galle im Zusammenhang stehen, läßt sich noch nicht klären. Wie NOVIKOFF und ESSNER (1960) haben wir diese Verdichtungen bei Gallenstauung in der Leber des Menschen verbreitert gefunden.

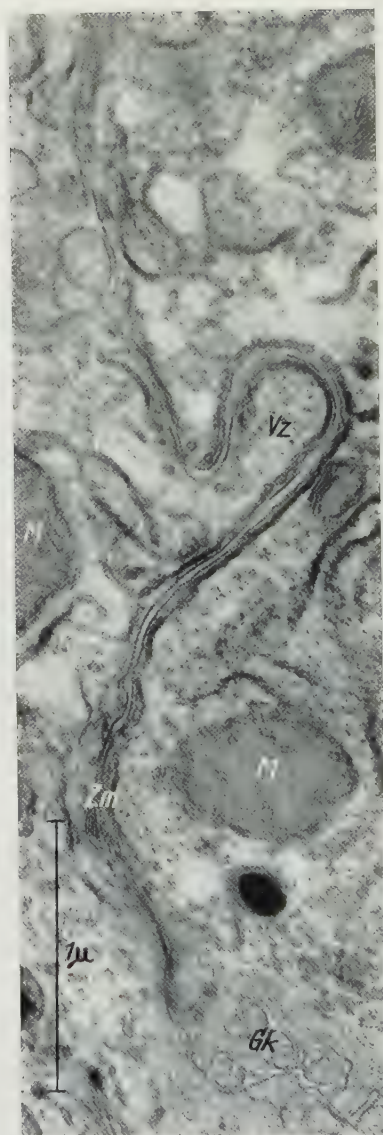
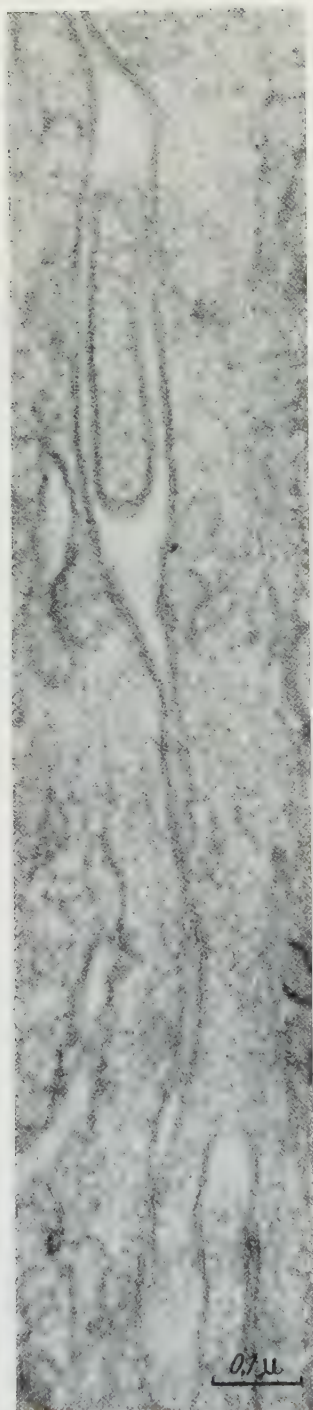


Abb. 7. Verzahnung (*Vz*) der Zellgrenzen der Goldhamsterleber. Hier Anlagerung von parallelen Membranen in beiden Leberzellen. *Gk* Gallenkapillare. *Zm* Zellmembran. *M* Mitochondrien. Aufn.-Nr. D 1137. Vergr. 7200:1. Ges.-Vergr. 36000:1

Abb. 6. Gebiet aneinandergrenzender Zellen in der Kaninchenleber. Wechselnd breiter Interzellularspalt. Zellmembran beiderseits dreifach konturiert. Aufn.-Nr. WF 204. Vergr. 15000:1. Ges.-Vergr. 150000:1

Nach histochemischen Untersuchungen enthalten die Mikrovilli im Bereich der Gallenkapillaren ATPase und 5-Nucleotidase (ESSNER, NOVIKOFF und MASEK 1958, NOVIKOFF und ESSNER 1960).

III. Die Leberzellmembran im Bereich der aneinandergrenzenden Parenchymzellen

Während der Aufbau der Zellmembran und ihrer Bildungen im Gebiet des Disséschen Raumes und der Gallenkapillaren nicht in jedem Falle eindeutige

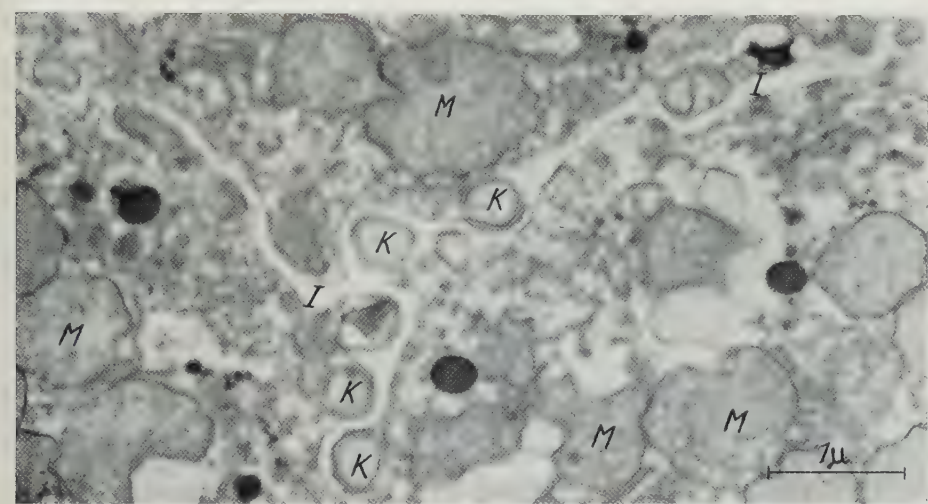


Abb. 8. Drei aneinandergrenzende Parenchymzellen der Kaninchenleber, 1 Std post mortem fixiert. Wechselnd breiter Interzellularspalt (*I*). Kugelförmig abgeschnürte Membranteile (*K*), die teilweise in den Interzellularraum abgestoßen werden. *M* Mitochondrien. Aufn.-Nr. D 43. Vergr. 7200:1. Ges.-Vergr. 21600:1

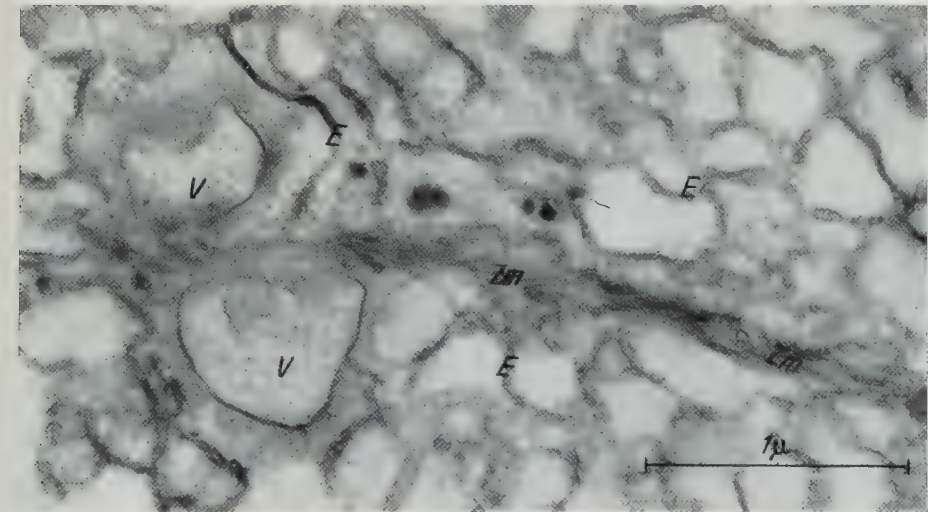


Abb. 9. Ineinanderübergehen der Zellbegrenzung (*Zm*) der Leberzellen des Goldhamsters. Nahe der Grenzmembran reichlich bläschenförmiges zu Membranen zusammengelagertes endoplasmatisches Retikulum (glatte Form des Ergastoplasmas) (*E*). *V* Intrazelluläre Vakuole mit scharfer Innenbegrenzung und bandartiger Verdichtung des umgebenden Grundplasmas. Aufn.-Nr. D 1268. Vergr. 12800:1. Ges.-Vergr. 38400:1

Unterschiede aufweist, treten Differenzen besonders in der Zone der aneinandergrenzenden Parenchymzellen hervor. Bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen finden wir eine etwa 100—120 Å breite osmiophile Leberzellmembran, die von der

gleichbreiten Außenmembran der Nebenzelle durch einen osmiophilen Spalt (150—200 Å) getrennt ist. Es kommt nicht nur zu vielfachen Verzahnungen der Zellen von wechselnder Breite und Tiefe, sondern es lassen sich auch häufig

Desmosomen beobachten. Dabei sind kurzstreckige Anlagerungen von Membranen gleicher Dicke wie die der Zellmembran zu finden.

Die Außenmembran der Kaninchenleberzelle im Gebiet der engen Verbindung zwischen zwei Parenchymzellen ist in vielen Fällen aus drei Lagen aufgebaut (Abb. 6) — nämlich aus 20 Å breiten osmiophilen Schichten, getrennt durch einen 20—30 Å breiten osmiophoben Zwischenraum. Der Interzellularspalt ist wechselnd breit. Beim Kaninchen sind Verzahnungen nur selten erkennbar, dagegen kommt es oft zu gemeinsamen Faltungen der Außenmembran beider Zellen. Schlußleisten in gallenkapillarenfernen Gebieten haben wir nur sehr selten beobachten können. Unter bestimmten Bedingungen, wie sie z. B. bei der Autolyse auftreten, wird der osmiophobe Interzellularraum breiter; es schnüren sich Membranteile zu kugelartigen Gebilden ab, die dann in den Zwischenzellraum abgestoßen werden (Abb. 8).



Abb. 10. Breiter Interzellularraum (*I*) zwischen zwei Parenchymzellen der Taubenleber. Parallel zur Zellmembran (*Zm*). Doppelmembranen des Ergastoplasmas (*E*). *M* Mitochondrien.

H Hämosiderin. Aufn.-Nr. WF 334. Vergr. 20 000:1.
Ges.-Vergr.: 60 000:1

Die Zahl der Einstülpungen und Verzahnungen der Leberzellmembran des Goldhamsters ist groß. Im Gebiet der Interdigitationen lagern sich außerdem noch ergastoplasmatische Doppelmembranen der Zellgrenze an (Abb. 7). Besonders charakteristisch ist das Ineinanderübergehen der Zellbegrenzung benachbarter Leberzellen, so daß der eindeutige Verlauf und die Zugehörigkeit jedes

Anteils der Membran zu einer der beiden Zellen nicht mehr sicher zu erheben ist (Abb. 9). Außerdem ist beim Goldhamster besonders in der Nähe dieses Teils der Zellwand ein auffälliger Reichtum der aus bläschenförmigen Formationen aufgebauten Membransysteme des endoplasmatischen Retikulum erkennbar, das vorwiegend während der Fütterung nach absolutem Hunger große Ausmaße annimmt (DAVID 1960). Ich glaube, daß die Ansammlung des endoplasmatischen Retikulum durch eine echte Neubildung bedingt ist. Die Art der Zellaußenmembran, wie sie beim Goldhamster vorliegt, ist ein wichtiger und sehr aktiver Zellbestandteil, der mehr als nur resorptive Aufgaben zu erfüllen hat. Als Besonderheit sind nahe der Zellmembran von dieser abgeschnürte Vakuolen zu finden, die eine scharfe innere Begrenzung besitzen und eine bandartige Verdichtung des umgebenden Cytoplasmas zeigen (Abb. 9).

Die Leberzelle der Taube wird durch eine einfache osmiophile Membran begrenzt. Im Vergleich mit den engen Verkittungen bei Säugetieren ist der Inter-



Abb. 11. Breiter Interzellularraum (*I*) zwischen zwei Parenchymzellen der Goldfischleber. Nahe der Zellmembran (*Zm*) hakenförmige Membranbruchstücke und Vakuolenbildung aus Teilstücken des Ergastoplasmas. *M* Mitochondrien. Aufn.-Nr. WF 461. Vergr. 15000:1. Ges.-Vergr. 150000:1

zellürraum zwischen den Leberzellen mit 700—2000 Å 5—15mal so breit. Der Außenmembran lagern sich in bestimmtem Abstand parallel Doppelmembran-

systeme des endoplasmatischen Retikulum ohne anhaftende Ribosomen an (Abb. 10). Ob diese von der Zellmembran gebildet werden oder aus dem Inneren des Cytoplasmas heranziehen, läßt sich nicht entscheiden. Auffällig ist, daß wir häufig von der Umgebung der Zellmembran bis in das Innere der Zelle Membrankomplexe verlaufen gesehen haben, die frei in der Grundsubstanz enden.

Die Zellmembran der Goldfischleber ist wie bei der Taube von der Nachbarzelle durch einen 600—1200—2500 Å breiten interzellulären Spalt getrennt (Abb. 11). Jedoch liegen im angrenzenden Cytoplasma charakteristische Unterschiede zu dieser Tierart vor. Im Gegensatz zu den langen Membranen bei der Taube haben wir beim Goldfisch nur hakenförmige Bruchstücke und kleinste Vakuolenbildungen finden können. In keinem Fall sind längere Membranteile sichtbar.

Die bisherigen Arbeiten über diesen Membranbezirk der Leberzelle erwähnen die Verzahnungen (FAWCETT 1955, 1958). Sonst sind nur wenig Besonderheiten bekannt. Die Zellmembranen sollen hier eine Breite von 80—100 Å (IZARD 1960) bis 200 Å (NEVILLE 1960) haben. Sie werden durch einen Spalt von 100—150 Å voneinander getrennt (FAWCETT 1955, IZARD 1960, NEVILLE 1960). Diese Ergebnisse entsprechen in etwa auch unseren. Vereinzelt werden außerdem noch Desmosomenbildungen erwähnt. Der dreischichtige Aufbau der einzelnen Membran in bestimmten Bereichen der Leberzellgrenze wird von ROBERTSON (1958, 1960) und IZARD (1960) mitgeteilt. Befunde an der Leber von Vögeln und Fischen sind uns bisher nicht bekannt geworden.

IV. Übersicht über die Ergebnisse

Die vergleichenden Untersuchungen über die Leberzellmembran bei verschiedenen Tieren lassen in vielen Fällen allein aus der Betrachtung der Membran in den angeführten Bereichen die Tierart erkennen (Abb. 12).

Bei der *Maus*, *Ratte* und dem *Meerschweinchen* sind die Differenzen nur gering, so daß hier eine eindeutige Charakterisierung nicht möglich ist. Diese drei Tierarten zeigen reichlich sinusoidale Mikrovilli, verzahnte Zellgrenzen mit einzelnen Desmosomen und zahlreiche Mikrovilli auch in den durch Schlußleisten begrenzten Gallenkapillaren. Das Grundplasma der Umgebung der Gallenkapillaren ist bei der Maus und der Ratte feingranulär, dagegen bandartig beim Meerschweinchen ausgebildet.

Die Epithelzelle der *Kaninchenleber* streckt gleichfalls zahlreiche Mikrovilli in den Disséschen Raum hinein. Die Zellmembran aneinandergrenzender Parenchymzellen zeigt nur Einstülpungen und keine Verdickungen; die Zwischenschicht ist unterschiedlich breit. Die Gallenkapillaren sind ebenfalls durch Schlußleisten begrenzt. Mikrovilli sind in nicht geringer Zahl vorhanden. Auffällig ist besonders die bei keinem anderen Tier zu findende breite bandartige Verdichtung des darunterliegenden Cytoplasmas mit der osmiophilen Abschlußleiste.

Die sinusoidalen Mikrovilli der Epithelzellen der *Goldhamsterleber* unterscheiden sich ebenfalls nicht von denen der übrigen Tiere. Als Charakteristikum weist die Membran der sich berührenden Parenchymzellen nicht nur tiefe Verzahnungen mit parallelen Anlagerungen weiterer Membranen auf, sondern es ist auch noch ein Ineinanderübergehen der Zellbegrenzung zu beobachten. Dazu

finden sich neugebildete Membranen des endoplasmatischen Retikulum im angrenzenden Cytoplasma. Die gallenkapillarennahen Zellmembranteile zeigen reichlich Mikrovilli, die bandartige Verdichtung ist schmaler als beim Kaninchen.

<u>Leberzell-</u> <u>membran</u>	<u>im Bereich des</u> <u>Disséschen Raumes</u>	<u>im Bereich der</u> <u>Gallenkapillaren</u>	<u>im Bereich der</u> <u>aneinandergrenzenden</u> <u>Parenchymzellen</u>
<i>Maus, Ratte, Meer- schwein- chen</i>			
<i>Kaninchen</i>			
<i>Goldhamster</i>			
<i>Taube</i>			
<i>Goldfisch</i>			

Abb. 12. Schematische Übersicht über die Struktur der Leberzellmembran im Bereich des Disséschen Raumes, der Gallenkapillaren und der aneinandergrenzenden Parenchymzellen bei den verschiedenen untersuchten Tierarten

Bei der *Taube* ist die Zahl der Mikrovilli im Gebiet des Disséschen Raumes nur gering, die Länge wechselnd. Die Außenmembran der aneinandergrenzenden Leberzellteile ist einfach konturiert; der interzelluläre Spaltraum ist 5—15mal

so breit wie beim Säugetier. Nahe der Zellmembran sind parallel angeordnete Membransysteme des endoplasmatischen Reticulum zu finden. Ein weiteres Kennzeichen sind die aus 4—5 Zellen gebildeten Gallenkapillaren, in deren Nähe sich die breiten Spalträume zu feinen Düsen verengern. Mikrovilli sind ebenfalls erkennbar, das darunterliegende Cytoplasma ist feingranuliert.

Die Epithelzelle der *Goldfischleber* weist nur wenige flache sinusoidale Mikrovilli auf. Typische Gallenkapillaren sind äußerst selten erkennbar. Der interzelluläre Spalt ist sehr breit, die Leberzellmembran einfach konturiert. Parallel zu ihr liegen im Cytoplasma Membranbruchstücke und kleine Vakuolen verschiedener Form und Größe.

Diskussion

Untersuchungen über den Aufbau und die Funktion der Zellmembran sind im letzten Jahrzehnt mehrfach durchgeführt worden (SWANN und MITCHINSON 1951, ROSENBERG und WILBRANDT 1952, ROTHSTEIN 1954, RUTHENSTROTH-BAUER und ZEININGER 1956, BURGEN 1957, ROBERTSON 1959, 1960). Ihr grundsätzlicher Bau ist also hinlänglich bekannt. So gilt es heute als feststehend, daß die Membranen aus Lipoproteinen bestehen und sich aus zwei durch einen osmophoben Spalt getrennten osmiophilen Lamellen aufbauen. Diese Struktur ist an den verschiedenen Geweben dargestellt worden. Sie fehlt häufig in Präparaten nach Osmiumsäurefixierung, ist dagegen leicht nach Fixierung mit Kaliumpermanganat zu erkennen (ROBERTSON 1958).

Mikrovilli sind bei vielen Zellarten zu beobachten (Übersicht bei POLICARD u. a. 1955). Jedoch wird im allgemeinen das Cytoplasma im Gebiet der Ausstülpungen als unstrukturiert angegeben (EKHOLM und SJÖSTRAND 1957, HELANDER und EKHOLM 1959, MOE 1960, SMITH und LITTAU 1960, BESSIS 1960). Querschnitte röhrenförmiger Binnenstrukturen, wie wir sie in den Mikrovilli der Gallenkapillaren der Kaninchenleber gesehen haben, sind bisher nur von STAUBESAND und SCHMIDT (1960) für die Deckzellen des Perikards beschrieben worden.

Die von uns beobachteten Desmosomen und Schlußleisten sind ebenso wie die entsprechenden Bildungen an Epithelzellen und anderen Elementen aufgebaut (HORSTMANN und KNOOP 1958, VOGEL 1958, FASSKE und THEMANN 1959, HIBBS und CLARK 1959, KARRER u. a. 1960).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Leberzellmembran und der von ihr abhängigen Bildungen hat *artspezifische Eigentümlichkeiten* ergeben. In welcher Weise diese Befunde mit bestimmten funktionellen Eigenschaften zu verbinden sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Zusammenfassung

Die Leberzellmembran und ihre Bildungen wurden im Bereich der Sinusoide, der Gallenkapillarwand und der aneinandergrenzenden Parenchymzellen bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Goldhamstern, Kaninchen, Tauben und Goldfischen vergleichend untersucht. Im Gebiet des Disséschen Raumes sind keine sicheren Unterschiede zu finden. Dagegen liegen im Bereich der Gallenkapillaren und der aneinandergrenzenden Parenchymzellen viele charakteristische Strukturelemente vor, so daß bei der Untersuchung dieser Membranteile eine Zuordnung der Leber zu einer bestimmten Tierart im allgemeinen möglich ist.

Literatur

- ARNOLD, J.: Haben die Leberzellen Membranen und Binnennetze? *Anat. Anz.* **32**, 257—260 (1908).
- BESSIS, M.: Die Zelle im Elektronenmikroskop. Sandoz-Monographien 1960.
- BURGEN, A. S. v.: The physiological ultrastructure of cell membranes. *Canad. J. Biochem.* **35**, 569—578 (1957).
- COSSEL, L.: Beitrag zur Ultrastruktur der Blutgewebsschranke in der Leber. *Beitr. path. Anat.* **120**, 133—158 (1959).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Lebersinusoiden bei Virushepatitis. *Klin. Wschr.* **1959**, 1263—1278.
- COSTA, A., G. WEBER, G. ZAMPI e U. IGNESTI: Microscopia elettronica su sezioni dei cosiddetti capillari biliari di secrezione (spazi biliari intercellulari) e comportamento di questi nella colostasi. *Arch. De Vecchi Anat. path.* **17**, 869—892 (1952).
- DAVID, H.: Die Morphologie der Hungerleber. *Habil.-Schr. Med. Fak. Humboldt-Universität Berlin* 1960.
- Die Leber bei Nahrungsmangel und Mangelernährung. Berlin: Akademie Verlag 1961.
- DAVIS, J. M.: Structure of the walls of the bile „canaliculi“ in mammalian liver cells. *Nature (Lond.)* **188**, 1123—1124 (1960).
- EDLUND, Y., and V. HANZON: Demonstration of the close relationship between bile capillaries and sinusoid walls. *Acta anat. (Basel)* **17**, 105—111 (1953).
- EKHOLM, R., and F. S. SJÖSTRAND: The ultrastructural organization of the mouse thyroid gland. *J. ultrastruct. Res.* **1**, 178—199 (1957).
- ESSNER, E., A. B. NOVIKOFF and B. MASEK: Adenosintriphosphatase and 5'Nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 711—716 (1958).
- FASSKE, R., u. H. THEMANN: Über das Deckepithel der menschlichen Mundschleimhaut. *Z. Zellforsch.* **49**, 447—463 (1959).
- FAWCETT, D. W.: Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J. nat. Cancer Inst.* **15**, 1475—1504 (1955).
- Structural specializations of the cell surface. In: *Frontiers in Cytology*, ed. by S. L. PALAY, S. 19—41. New Haven: Yale University Press 1958.
- HAMA, K.: The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 575—578 (1960).
- HELANDER, H., and R. EKHOLM: Ultrastructure of epithelial cells in the fundus glands of the mouse gastric mucosa. *J. ultrastruct. Res.* **3**, 74—83 (1959).
- HIBBS, R. G., and W. H. CLARK: Electron microscope studies of the human epidermis. The cell boundaries and topography of the Stratum Malpighi. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 71—76 (1959).
- HORSTMANN, E., u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Studien an der Epidermis. I. Rat-tenpfote. *Z. Zellforsch.* **47**, 348—362 (1958).
- IZARD, J.: L'hépatocyte humain normal et pathologique. Paris: Librairie Arnette 1960.
- KARRER, H. E., N. KENT and R. CALANE: Cell interconnections in normal human cervical epithelium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 181—184 (1960).
- MOE, H.: The ultrastructure of BRUNNER's glands of the cat. *J. ultrastruct. Res.* **4**, 58—72 (1960).
- NEVILLE, D. M.: The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 413—422 (1960).
- NOVIKOFF, A. B., and E. ESSNER: The liver cell. Some new approaches to its study. *Amer. J. Med.* **29**, 102—131 (1960).
- PARKS, H. F.: The hepatic sinusoidal endothelial cell and its histological relationships. *Proc. Stockholm Conf. of Electron Microscopy 1956*, S. 151—153. Stockholm: Almqvist & Wiksell 1957.
- POLICARD, A., M. BESSIS, A. COLLET et L. GILTAIRE-RALYTE: Une information submicroscopique cellulaire peu connue: Les microvillosités. *Bull. Micr. appl., Ser. II* **5**, 133—138 (1955).

- ROBERTSON, J. D.: The ultrastructure of cell membrane. *Anat. Rec.* **130**, 440 (1958).
- The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. In: The structure and function of subcellular components, ed. by E. M. CROOK, S. 3—43. Cambridge: At the University Press 1959.
- A molecular theory of cell membrane structure. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, Bd. II, S. 159—171. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- ROSENBERG, T., and W. WILBRANDT: Enzymatic processes in cell membrane penetration. *Int. Rev. Cytol.* **1**, 65—92 (1952).
- ROTHSTEIN, A.: The enzymology of the cell surface. In: *Protoplasmatologia*, Bd. II, E 4. Wien: Springer 1954.
- ROUILLER, C.: Les canalicules biliaires. Étude au microscope électronique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **148**, 2008—2011 (1954).
- Les canalicules biliaires. Étude au microscope électronique. *Acta anat. (Basel)* **26**, 94—109 (1956).
- RÜTTNER, J. R., u. A. VOGEL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Lebersinusoidwand. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **41. Tagg** (1957), 314—320 (1958).
- RUTHENSTROTH-BAUER, G., u. K. ZEININGER: Die Membranen von Leberzellen und deren geformter Bestandteile. *Naturwissenschaften* **43**, 426 (1956).
- RYTER, A., et E. KELLENBERGER: L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. *J. ultrastruct. Res.* **2**, 200—214 (1958).
- SMITH, D. S., and V. C. LITTAU: Cellular specialization in the excretory epithelia of an insect, *Macrosteles fascifrons* Stal (Homoptera). *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 103—134 (1960).
- STAUBESAND, J., u. W. SCHMIDT: Zur Histologie des Herzbeutels. I. Mitt. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Deckzellen des Peri- und Epicards. *Z. Zellforsch.* **53**, 55—68 (1960).
- SWANN, M. M., and J. M. MITCHINSON: Birefringence of cytoplasm and cell membranes. In: *Progress in Biophysics*, Bd. 2, ed. by J. A. V. Butler, J. T. Randall, S. 1—16. London: Pergamon Press LTD 1951.
- VOGEL, A.: Zelloberfläche und Zellverbindungen im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **41. Tagg** (1957), 284—295 (1958).
- WASSERMANN, F.: Electron microscopic observations about the structure of the wall of the hepatic sinusoids. *Anat. Rec.* **127**, 488 (1957).
- The structure of the wall of the hepatic sinusoids in the electron microscope. *Z. Zellforsch.* **49**, 13—22 (1958).

Doz. Dr. med. habil. HEINZ DAVID,
Pathologisches Institut der Charité, Berlin N 4,
Schumannstr. 20—21

From the Histological Department, University of Uppsala (Head: Prof. M. WRETE, M. D.), and the Physiological Department, Royal Veterinary College, Stockholm 51, Sweden (Head: Prof. Y. ZOTTERMAN, M. D.)

HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON THE PANCREATIC ISLETS IN NORMAL AND OBESE-HYPERGLYCEMIC MICE*

By

BO HELLMAN, CLAES HELLERSTRÖM, STIG LARSSON and SVEN BROLIN

With 7 Figures in the Text

(Received May 12th, 1961)

Mice with a recessive trait for hyperglycemia and obesity were originally found at the Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory, Bar Harbor, U.S.A. (BLEISCH, MAYER and DICKIE 1952, and others). The islets of Langerhans in the obese-hyperglycemic animals (AO-mice) exhibit considerable hyperplasia, and their total volume is approximately 10 times larger than in normal litter mates (AN-mice) (GEPTS, CHRISTOPHE and MAYER 1960, HELLMAN, BROLIN, HELLERSTRÖM and HELLMAN 1961). In the hyperplastic islets there are histological signs indicating greatly increased functional activity of the B cells with pronounced degranulation (WRENSHALL, ANDRUS and MAYER 1955, THIEL 1958) and enlargement of nuclei and nucleoli (HELLMAN and PETERSSON 1960) of these cells. In agreement with these findings, the insulin-like activity in the plasma also appears to be greatly raised in adult AO-mice, in spite of the occurrence of a simultaneous increase in the blood sugar level, which often exceeds 250 mg-% (CHRISTOPHE, DAGENAIS and MAYER 1959).

According to MAYER, ANDRUS and SILIDES (1953) the A cells of the islets are probably, by their production of a hyperglycemic factor, of essential importance in the etiology of the obese-hyperglycemic syndrome, a view, however, which has not been supported in later investigations (cf. THIEL 1958, HELLMAN 1961). The confusion which may still be said to prevail concerning the role of the islets in the obese-hyperglycemic syndrome, is related to the great difficulties in identifying the A and B cells in the AO-mice with the ordinary granule staining methods. The present investigation has therefore been carried out with the aim of studying the two types of islet cells in these animals with, mainly, histochemical methods. By comparative studies of a control material (AN-mice) it has also been possible to gain new knowledge of the islet structure in normal mice.

Material and Methods

15 male mice, 4—8 months old, with the obese-hyperglycemic syndrome, and an equal number of their lean litter mates were used for the investigation. The animals, which weighed about 50 g and 25 g respectively, had unrestricted access to food and water. They were all born in the colony at the Histological Institute in Uppsala.

The mice were killed by hyperextension of the neck. Small pieces of the splenic part of the pancreas were immediately removed and frozen in isopentane, cooled to -70°C in a bath of alcohol and dry ice. Other pieces of pancreas were fixed in ice-cold Bouin's solution, 10 per cent formalin or H_2S -saturated 70 per cent alcohol. The frozen tissue was blotted

* This work was aided by grants from the Swedish Medical Research Council.

rapidly with filter paper and was then either sectioned immediately or stored for, at the most, two days in a freeze box before sectioning.

Granule content: 5 μ thick sections were cut in a cryostat (Pearse-Slee) at -25°C and mounted in glycerin-gelatin either unfixed or treated with 6 per cent formalin. The preparation was then studied immediately in a Leitz Ortholux microscope with dark field illumination (Leitz bicentric immersion-dark field condensor D 1.20 A).

Zinc: a) 1 g dithizon (Merck) was dissolved in a mixture of 10 ml absolute alcohol and 40 drops concentrated ammonia according to MASKE (1957). The solution was diluted with 100 ml distilled water and injected in a dose of 0.1 mg/g body weight into a tail vein. Five minutes later the animals were killed by hyperextension of the neck. Cryostat sections, 5 μ thick, mounted on glass slides, were fixed by osmium vapor and mounted in a 50 per cent sorbitol solution. They were then examined immediately in the microscope with dark field illumination (see above).

b) Pancreas was fixed in H_2S -saturated 70 per cent alcohol, embedded in paraffin and sectioned at 5 μ . The zinc sulphide in the islets was then made visible with a solution of silver nitrate, hydroquinone and citric acid in gum arabic according to VOIGT (1959).

Alkaline phosphatases: 10 μ thick cryostat sections were post-fixed in 6 per cent calcium acetate formalin at 0°C for 15 minutes. The sections were treated according to GOMORI's calcium-cobalt method for alkaline phosphatases with sodium β -glycerophosphate (Eastman Org. Chemicals) as substrate (PEARSE 1960). They were incubated with the substrate at 37°C for 1 hour at pH 9.4. Control sections in a medium without substrate remained unstained.

Acid phosphatases: 10 μ thick cryostat sections were post-fixed in acetone at 0°C for 1 hour. The sections were treated according to GOMORI's lead nitrate method for acid phosphatases with sodium β -glycerophosphate as substrate (PEARSE 1960). They were incubated with the substrate at 37°C for 2 hours at pH 5.0. Control sections in a medium without substrate remained unstained.

Glycogen: Pancreatic tissue from young (4 months) and old (14 months) mice was fixed in ice-cold Bouin solution, cut into 10 μ thick paraffin sections and then stained with periodic-acid-Schiff according to HOTCHKISS (1948).

Masked lipids and sudanophil substance: Formalin fixed pancreatic tissue was cut on a Leitz freezing microtome into 15 μ thick sections. The free floating sections were treated with a diluted solution of benzpyrene (Hoffman La Roche) and caffeine and were then mounted in distilled water on fluorescence-free glass slides (BERG 1951). The section was then examined immediately in a Leitz Ortholux microscope with ultraviolet illumination from a Philips CS 150 W Hg lamp (Filter: UG 2 mm, CuSO_4 13 mm and Leitz Euphos 2.5 mm). Photography was carried out with a Zeiss small-picture camera on Ilford PAN F film with an exposure time of 3.0 min. for all pictures. The films were processed under carefully standardized conditions.

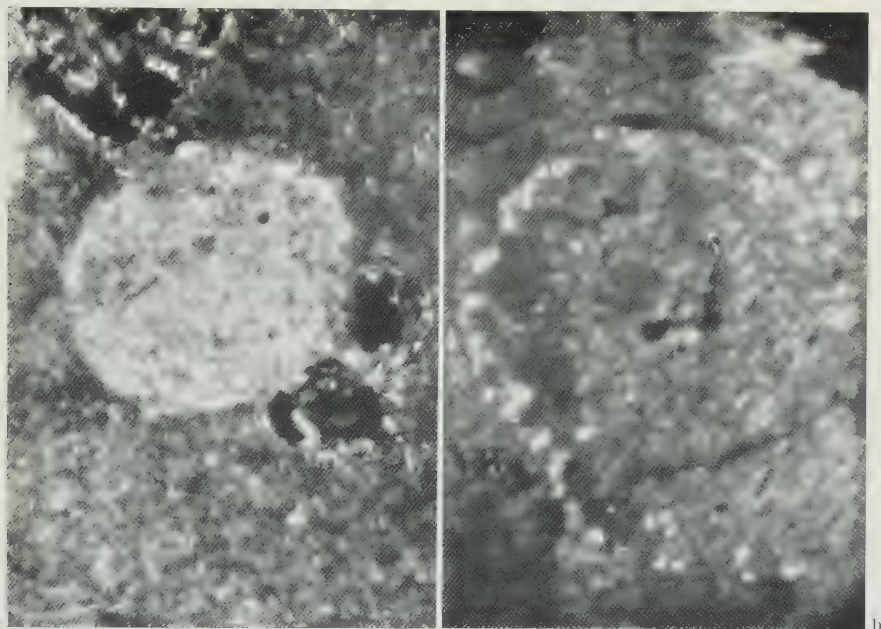
For the study of sudanophil substance the method of CASSELMAN (1959), with Sudan Black B (Gurr) dissolved in isopropanol, was used.

Golgi apparatus: Pieces of pancreas were fixed and silver impregnated en bloc according to AOYAMA (1930). Seven μ thick paraffin sections were then stained with GOMORI's hematoxylin (BENCOSME 1952).

Results

With dark field microscopy of cryostat sections, either fresh or post-fixed in formalin, it was easy to identify islets by means of the bright granule contents of the islet cells. In the AN-mice the occurrence of two different cell types was observed, namely, more central cells with yellowish white, less bright granules, which were often localized to the capillary pole of the cells, and peripheral cells with very bright, silver white granules, which were mainly accumulated perinuclearly (Fig. 1a). In the central parts of the islets an almost total absence of the yellowish white granulation was noted in several AO-mice (Fig. 1, b and c); this was especially obvious in the case of the large islets. In the AO-mice also, silver white cells occurred in the periphery of the islets, where they were situated

close to the capillaries. In both of the animal groups these cells were well granulated, those in the AO-mice appearing with particularly strong contrast against



the rest of the degranulated islet tissue (Fig. 1b).

When fresh pancreatic sections from AN-mice injected with dithizone were studied with ordinary light microscopy, the islets appeared only weakly red stained. In dark field illumination, on the other hand, these islets appeared as intensely bright, orange yellow, well demarcated areas against the background of the weakly yellowish green exocrine parenchyma (Fig. 2a). At a higher magnification the cytoplasm of the islet cells was seen to be interspersed by orange yellow granules, which were usually accumulated in the capillary pole



Fig. 1a—c. Fresh cryostat sections of mouse pancreas in dark field illumination. a Islet of Langerhans from an AN-mouse. There are peripherally some (silver white) A-cells, which however contrast rather poorly against the well granulated (yellowish white) B-cells in the more central parts of the islet. The darkest parts in the exocrine parenchyma are blood vessels ($\times 500$). b Large islet from an AO-mouse. The peripheral A-cells appear here with good contrast against the degranulated B-cells ($\times 500$). c High power view of the same islet section as in Fig. 1b. The wellgranulated, light A-cells demarcate the islet against the exocrine parenchyma. The arrow indicates an A-cell with an especially obvious perinuclear localization of granules ($\times 1000$)

of the cells. While all the islets in the AN-mice thus exhibited an abundant orange yellow granulation, the large and medium sized islets of the AO-mice were greatly degranulated. As may be seen in Fig. 2b, only small collections of granules around single capillaries were found in the central parts of the islets in these animals, while the peripheral islet cells were usually more abundantly granulated. The orange yellow zinc-dithizone complex was dissolved out of the cytoplasm after 6—24 hours, after which the natural silver white and yellowish

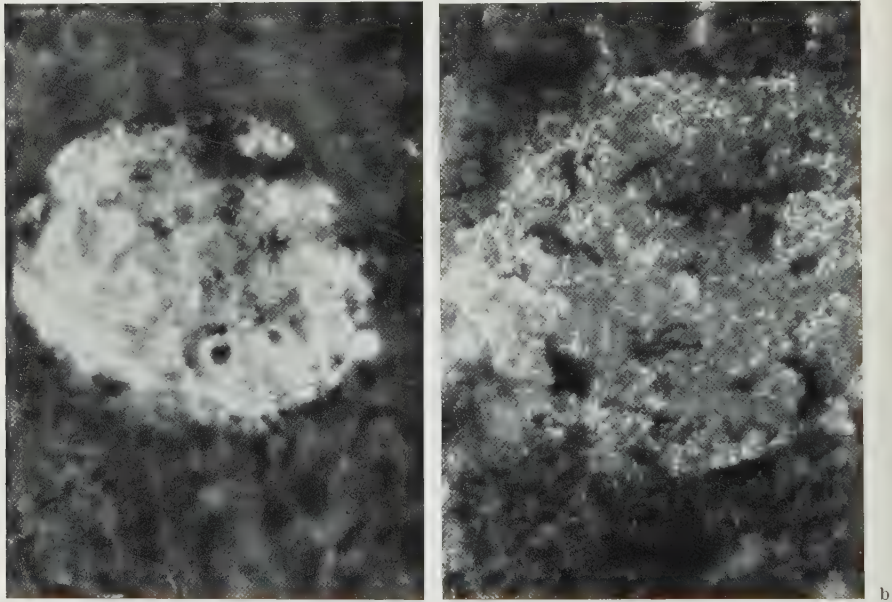


Fig. 2 a and b. Fresh cryostat sections of pancreas in dark field illumination from dithizone-injected mice. a Islet of Langerhans from an AN-mouse. The islet cells are well filled with light (orange yellow) zinc dithizonate granules ($\times 700$). b Islet from AO-mouse. Only sparse occurrence of zinc dithizonate granules in the B-cells, while in the upper part of the islet some peripheral A-cells show a more abundant granulation ($\times 500$)

white granulation, described above, was seen. In this way it was possible to show that the more abundant peripheral granulation in the islets of the AO-mice was chiefly dependent on cells with silver white granules. With the sulphide-silver method described by VOIGT (1959) for the demonstration of zinc, a considerable blackening of the islets was obtained in the AN-mice, while the exocrine parenchyma remained unstained (Fig. 3a). In the AO-mice a weaker reaction was observed in the centrally situated islet cells, where the blackening was most pronounced in the capillary poles of the cells (Fig. 3b).

A positive reaction for alkaline phosphatases was noted for the islets both within a peripheral zone bordering the exocrine parenchyma and in the capillary walls (Fig. 4, a and b). In the AN-mice the majority of the islet capillary walls were strongly phosphatase positive (Fig. 4a), while corresponding structures in the AO-mice were for the main part completely negative (Fig. 4b). In the AO-mice the phosphatase positive peripheral boundary zone was narrow, and in some places completely absent. In the AO-mice, in contrast to the AN-animals, there

was a weak activity in the nuclei of the islet cells (Fig. 4b). A comparison between Figs. 4a and 4c shows that the distribution of alkaline phosphatases within the islets was in general the same in AN-mice as in rats. In both the AO- and the AN-mice alkaline phosphatases were found within the exocrine parenchyma in the walls of the capillaries and smaller vessels.

The islets showed a positive reaction to acid phosphatases in both the AN- and AO-mice (Fig. 5, a and b). The dark brown islet tissue appeared in sharp contrast to the relatively weakly stained exocrine parenchyma. No differences

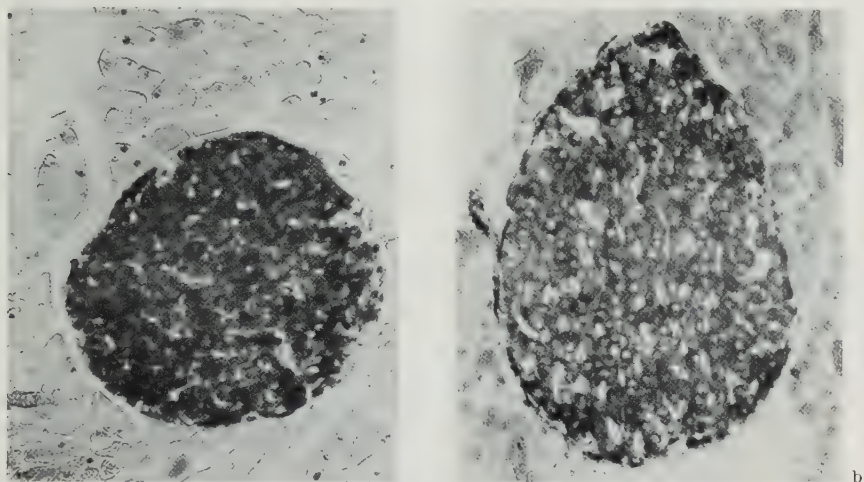


Fig. 3 a and b. Section from paraffin-embedded mouse pancreas, to which VOIGT's (1959) reaction to zinc has been applied. a Considerably blackened islet from AN-mouse. Exocrine parenchyma almost completely unstained ($\times 300$). b Islet from an AO-mouse, in which only a moderate reaction to zinc has occurred in spite of the developing time in silver-hydroquinone solution being the same as for the islet in Fig. 3a ($\times 300$)

were observed between the two animal groups as regards the site or activity of the acid phosphatases.

PAS-staining of the pancreas resulted in a weakly positive reaction in the islets which, in both the AN- and the AO-mice, was localized to the capillary walls and the connective tissue component. In older animals the amount of positively reacting connective tissue in the islets was considerably increased, but no mutual differences between the AN- and AO-mice were observed. There was no evidence for intracellular storage of glycogen in the A or B cells.

In benzpyrene-treated pancreatic sections the light bluish white fluorescing islets could be easily identified against the weaker fluorescence of the exocrine parenchyma (Fig. 6, a and b). Both in the islets and the exocrine parenchyma, the cell nuclei were darkly outlined against the light cytoplasm, while the blood vessels and capillaries did not fluoresce. The greatest islet fluorescence was observed throughout in the AO-animals, and the contrast against the surroundings was also greater in these mice. Islets could also be identified in control sections which had only been treated with a semisaturated caffeine solution, but in this case as dark areas against the background of the weak blue natural

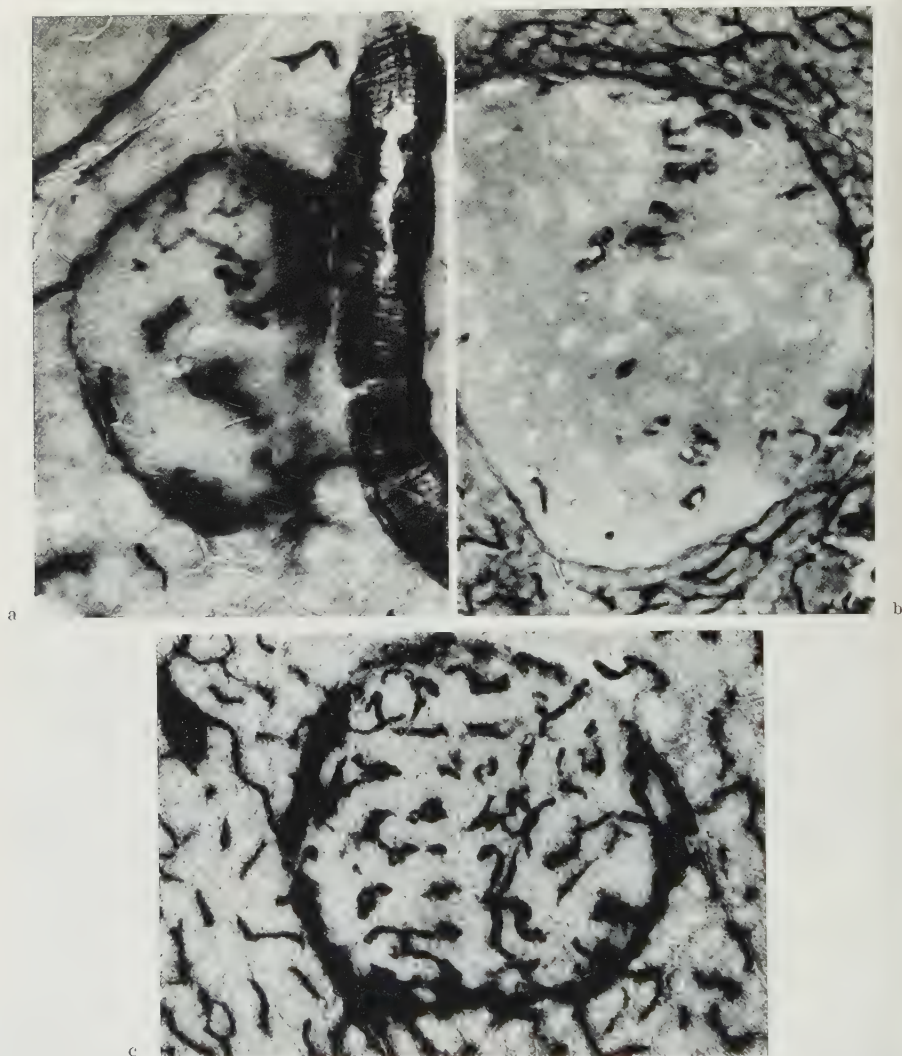


Fig. 4a—c. Cold formalin fixed cryostat sections from mouse and rat pancreas treated according to GOMORI's calcium-cobalt method for alkaline phosphatases. a Islet of Langerhans from an AN-mouse with strongly positive reaction to alkaline phosphatases in the peripheral regions and capillary walls. In the centre of the islet, however, two negatively reacting capillaries can be distinguished. In the exocrine parenchyma the phosphatase activity is found in the capillary walls, and, to the right of the picture, in a larger blood vessel ($\times 225$). b Large islet from an AO-mouse with a positive reaction to alkaline phosphatases in only a few capillaries and in a narrow peripheral zone on the borderline with the exocrine parenchyma. A weak activity is also found in the cell nuclei. Observe the considerable phosphatase activity in the capillaries of the exocrine parenchyma ($\times 100$). c Islet from normal rat with a strongly positive reaction to alkaline phosphatases in the capillaries and in a relatively wide zone on the borderline with the exocrine parenchyma ($\times 140$)

fluorescence of the exocrine parenchyma. Neither in AN- nor in AO-mice was any sudanophilia found in the islet cells after staining with Sudan Black B.

As may be seen in Fig. 7a, the Golgi apparatus in the islets of the AN-mice were usually relatively large and well developed, with considerable variation in the configuration. In the AO-mice, where a usually kidney-shaped Golgi

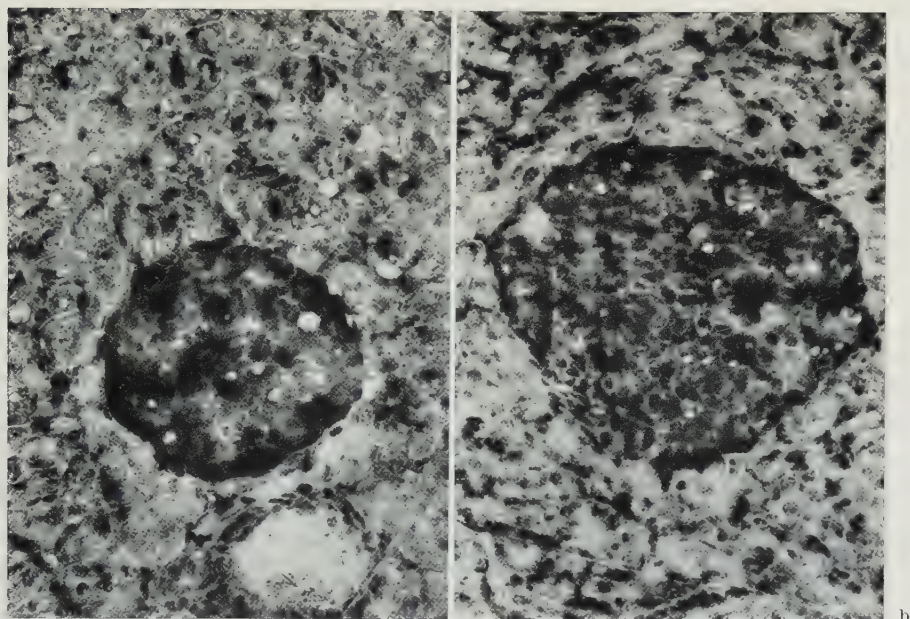


Fig. 5 a and b. Cold acetone fixed cryostat sections from mouse pancreas treated according to GOMORI's lead nitrate method for acid phosphatases. a Islet from an AN-mouse. The dark islet tissue is outlined in sharp contrast to the surrounding exocrine parenchyma ($\times 140$). b Islet from an AO-mouse. Compared with Fig. 5a no obvious differences in localization or activity are noted in the acid phosphatases ($\times 225$)

apparatus enveloped the nucleus in the islet cells, this consisted of a thin, blackened peripheral border, which surrounded a completely unstained inner part (Fig. 7b). In many cases, however, this typical structure was lacking, and then only scattered blackened fragments or transitional forms, which were beginning to disintegrate, were found in the cytoplasm.

Discussion

The technique of studying the granule content of the islets with dark field illumination microscopy of fresh frozen sections has been previously used by LOGOTHETOPOULUS and SALTER (1960). These authors were able to demonstrate, in the islets of Langerhans in the rabbit, a silver white granulation in the A cells, while the B cells, on the other hand, were reported as lacking visible granules. It is therefore worthy of observation that it was possible to demonstrate granules in both types of islet cells in mice, namely, a bright silver white granulation mainly in the peripheries of the islets, and a weaker yellowish white granulation in more centrally situated cells. The A cells have in the mouse, as in the rat, an overwhelmingly peripheral localization in the islets (FERNER 1952), and it therefore seems justifiable, even in the case of the mouse, to regard the yellowish white granulated cells as B cells and those with silver white granules as probably being A cells; by which name they will be subsequently referred to here. The possibility of studying separately the granulation of the A and B cells in thin (preferably not more than 5μ thick) unstained cryostat sections from fresh

pancreatic tissue means, moreover, a considerable gain in time and also a greatly increased certainty in the assessment of the granule content of these cells. The sources of error which are associated with fixing, embedding and histological staining are thus avoided, and the A and B cells also exhibit greater differences in dark field microscopy than after the conventional differential staining methods, which have been found difficult to adapt satisfactorily to the islets even from normal mice (cf. PARAKKAL 1961). WRENSHALL, ANDRUS and MAYER (1955)

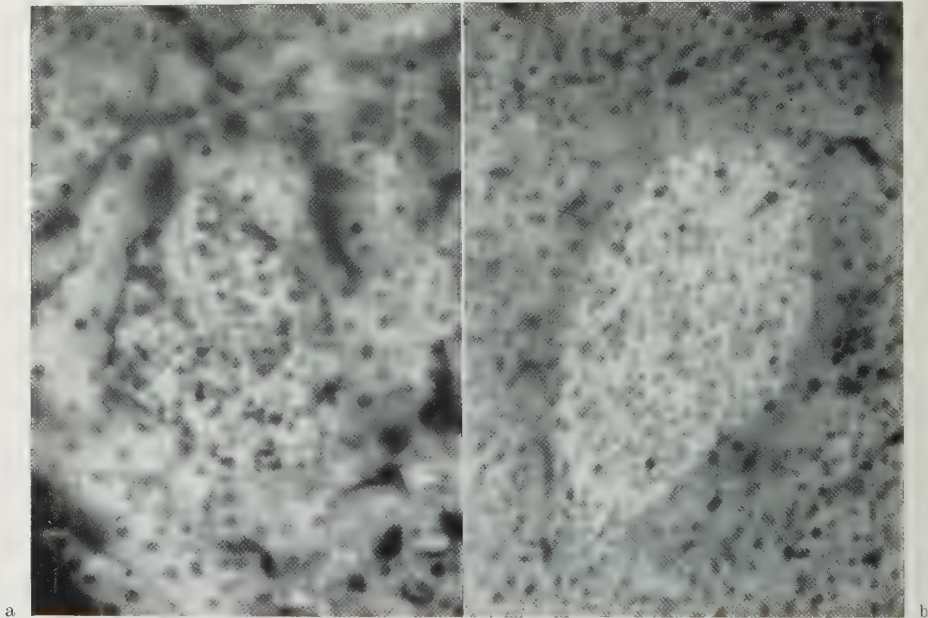


Fig. 6a and b. Fluorescence microscopic pictures of formalin-fixed mouse pancreas treated with a benzpyrene-caffeine solution according to BERG (1951). a In the centre of the picture there is an islet of Langerhans from an AN-mouse. Note that while the cell nuclei are dark, the strongest fluorescence is found perinuclearly in both the islet cells and the surrounding exocrine cells ($\times 350$). b Strongly fluorescing islet from an AO-mouse ($\times 350$)

and THIEL (1958) found, with ordinary granule staining methods on fixed material, a pronounced degranulation in the majority of the islet cells in AO-mice. This they interpreted as an expression of the raised functional activity in the B cells. We have been able to confirm the existence of such a degranulation in the B cells of the AO-mice. The A cells, however, were well filled by granules, an observation which is contrary to the view that the activity of the A cells is also raised in the obese-hyperglycemic syndrome.

After the intravenous administration of dithizone to rabbits, LOGOTHETOPOULUS and SALTER (1960) found with dark field microscopy that the islets contained intensely bright, orange stained granules, which in visible light had a violet red tinge that, according to WOLFF and RINGLEB (1954) and MASKE (1957), may be ascribed to zinc dithizonate. Our observations in mice are in agreement with the results in the rabbit. Since, however, the granulation appeared to be relatively weak in visible light, we have concentrated on dark field studies. MASKE (1957) maintained that granules found in the islet cells after the admini-

stration of dithizone were not identical with those which can be stained by means of ordinary histological granule staining methods. The fact that we were able to observe the natural silver white and yellowish white granulation in the islet cells, when the large orange yellow zinc dithizonate granules had dissolved away, not only supports this view but also made possible a comparative study of the zinc content of both the A and B cells in the same section. Thus it was

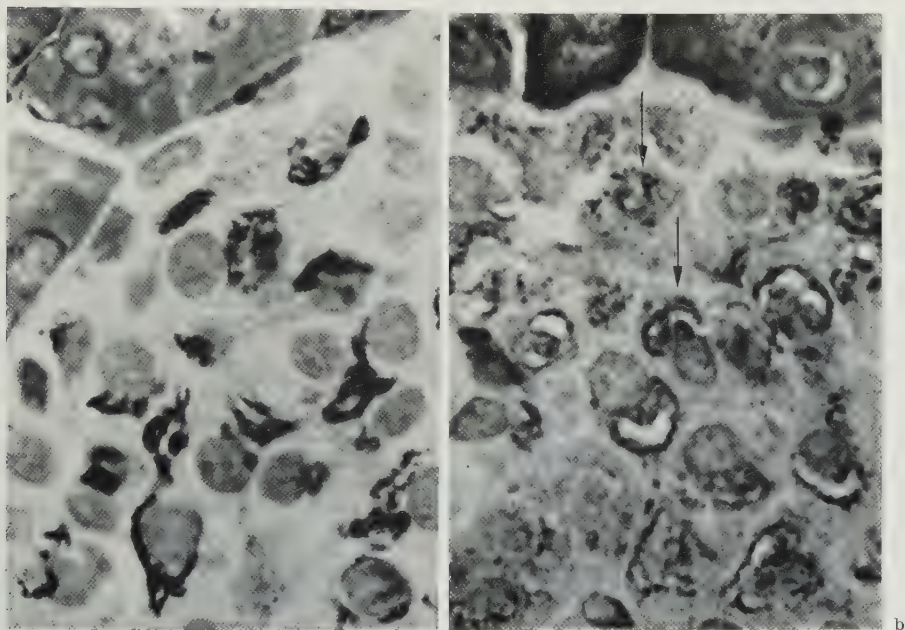


Fig. 7a and b. Paraffin sections from mouse pancreas, which have been fixed and silver impregnated according to AOYAMA (1930) for demonstration of the Golgi apparatus. Counterstaining with GOMORI's hematoxylin. a Peripheral part of an islet from an AN-mouse. The black Golgi apparatus is found close to the cell nuclei ($\times 1400$). b Peripheral part of an islet from an AO-mouse. A kidney-shaped Golgi apparatus with unstained inner part is found in several cells close to the nuclei, but cells with a beginning (lower arrow) or total (upper arrow) fragmentation of the Golgi apparatus can also be distinguished ($\times 1400$)

apparent that the zinc dithizonate in the islets of the AO-mice was mainly situated in peripheral A-cells. The high functional activity of the B-cells in the AO-animals is probably the explanation for the low zinc concentration in the cytoplasm of these cells (cf. MASKE 1957).

The occurrence of alkaline phosphatases in the peripheral regions of the islets, both in rats [DEMPSEY, GREEP and DEANE (1948), SOULAIRAC and DESCLAUX (1951) and GÖSSNER (1958), etc.] and AN-mice is evidence for the presence of this enzyme in the A-cells. HELLMAN (1961) found that the relative frequency of argyrophil A-cells in the islets of AO-mice was greatly reduced; this supports the view that the B/A cell number ratio is especially high in the obese-hyperglycemic syndrome. The low peripheral activity of alkaline phosphatases could thus in part be a result of the fact that the hyperplastic islets have a relatively low A-cell content. The low phosphatase activity in the islet capillaries of the AO-mice is worthy of note, both as regards the abundant vascularization in these

islets (HELLERSTRÖM and HELLMAN 1961) and the absence of a corresponding decrease in activity in the capillaries of the exocrine parenchyma. The low phosphatase activity of the vascular components may be due to the fact that the capillaries in the islets of AO-mice appear to have very thin walls, often forming sinusoids.

GÖSSNER (1958), who found an abundant occurrence of acid phosphatases in the islets of LANGERHANS in man and the rat, considered that in the rat the phosphatase activity was probably limited to the B-cells of the islets. It is evident from our observations that there is a high activity of acid phosphatases in both AN- and AO-mice. The method used did not, however, allow any definite assessment of the enzyme activity in the A-cells (cf. PEARSE 1960).

The fluorescence of the islets in frozen sections, treated with benzpyrene, has been interpreted as indicating the presence of lipids in the islet cells of both AN- and AO-mice. Small "lipid drops" have previously been observed in the islet cells in living mice (O'LEARY 1930), and in man sudanophil granules, which give a yellowish brown fluorescence to the islet cells, may regularly be found (FERNER 1952). In the mice studied in this investigation, neither sudanophil granules nor any other obvious natural fluorescence could be found in the islets. This indicates that the strong fluorescence after benzpyrene treatment originates from finely dispersed, masked lipids.

Glycogen storage has been reported in the islet cells after prolonged hyperglycemia, as for example in human diabetics and alloxan-diabetic and cortisone-treated rabbits (TORESON 1951, LAZARUS and BENCOSME 1956). In agreement with these observations, abundant storage of glycogen in the islets has also been found in alloxan-diabetic rats (HELLERSTRÖM and HELLMAN, unpublished). It is therefore worthy of observation that in spite of the existence of prolonged and considerable hyperglycemia, AO-mice appear to lack completely glycogen storage in the islet cells.

Enlargement and fragmentation of the Golgi apparatus is generally regarded as an expression of a high functional activity in the B-cells of the islets (BATTS, GAAL and TIPTON 1959). Since the Golgi apparatus showed pronounced changes of this kind in the AO-mice, this thus constitutes further confirmation of previous evidence (WRENSHALL, ANDRUS and MAYER 1955, THIEL 1958, HELLMAN and PETERSSON 1960) that the functional activity in the B-cells of the islets is increased in the obese-hyperglycemic syndrome.

Summary

In the islets of Langerhans in mice with the American variety of the obese-hyperglycemic syndrome (AO) and their thin litter mates (AN) the following observations were made:

1. In cryostat sections of fresh pancreatic tissue from AN-mice, both more centrally situated islet cells with yellowish white granules, and peripherally situated cells with brighter silver white granules were found with dark field microscopy. While the central cells were considerably degranulated in the AO-mice, the peripheral cells were also well filled with granules in these animals. The technique described offers, especially in the AO-mice, better possibilities of

differentiation of the islet cells than with the granule staining methods of fixed pancreatic material, which are now generally used.

2. After intravenous injection of dithizone, abundant orange yellow zinc dithizonate granules were found in all islet cells with dark field microscopy of cryostat sections from fresh pancreatic tissue of AN-mice. By dissolving out these granules, the zinc content could be related to the different types of islet cells. It was possible in this way to show that the zinc in the islets of the AO-mice was mainly situated in the peripheral cells, containing the silver white granulation typical of untreated animals in dark field. The occurrence of a lower zinc content in the centrally situated islet cells in the AO-mice was also evident from the so-called "sulphide-silver method".

3. A positive islet reaction to both acid and alkaline phosphatases was obtained in the AN-mice. The alkaline phosphatase activity was high in the peripheral parts of the islets of AN-mice, but much lower in the AO-mice. While the majority of islet capillaries were strongly positive as regards alkaline phosphatases in the AN-mice, in the AO-mice they were for the most part completely negative.

4. In spite of the existence of a prolonged hyperglycemia, no storage of glycogen could be demonstrated in the islets of the AO-mice. With fluorescence microscopy, the occurrence of masked lipids in the islets was observed in the AN-mice, and to an even higher degree in the AO-mice. On the other hand the sudanophilic reaction was negative throughout. The raised functional activity in the islet B-cells of the AO-mice was reflected in an enlargement and fragmentation of the Golgi apparatus.

References

- AOYAMA, A.: Cadmium fixative for Golgi apparatus. *Z. wiss. Mikr.* **66**, 489 (1930).
BATTIS, A. A., S. A. GAAL and D. L. TIPTON: Changes in the Golgi apparatus of the islets of Langerhans in the rat following glucose and insulin administration. *Endocrinology* **64**, 503—512 (1959).
BENCOSME, S. E.: Studies on the methods of staining the islet cells of the pancreas. *A.M.A. Arch. Path.* **53**, 87—97 (1952).
BERG, N. O.: A histological study of masked lipids. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* **90** (1951).
BLEISCH, V. R., J. MAYER and M. M. DICKIE: Familial diabetes mellitus in mice associated with insulin resistance, obesity and hyperplasia of the islands of Langerhans. *Amer. J. Path.* **28**, 369—385 (1952).
CASSELMAN, B.: *Histochemical Technique*. London: Methuen & Co 1959.
CHRISTOPHE, J., Y. DAGENAIS and J. MAYER: Increased circulating insulin-like activity in obese-hyperglycemic mice. *Nature (Lond.)* **184**, 61—62 (1959).
DEMPSEY, E. W., R. O. GREEP and H. W. DEANE: Changes in the distribution and concentration of alkaline phosphatases in tissues of the rat after hypophysectomy or gonadectomy, and after replacement therapy. *Endocrinology* **44**, 88—103 (1949).
FERNER, H.: *Das Inselsystem des Pankreas*. Stuttgart: Georg Thieme 1952.
GEPTS, W., J. CHRISTOPHE and J. MAYER: Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome. Lack of effect of carbutamide. *Diabetes* **9**, 63—69 (1960).
GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* **1**, 48—96 (1958).
HELLERSTRÖM, C., and B. HELLMAN: The blood circulation in the islets of Langerhans visualized by the fluorescent dye vasoflavine. *Acta Soc. Med. upsalien.* **66**, 88—94 (1961).
HELLMAN, B.: The occurrence of argyrophil cells in the islets of Langerhans of American obese-hyperglycemic mice. *Acta endocr. (Kbh.)* **36**, 596—602 (1961).
— S. BROLIN, C. HELLERSTRÖM and K. HELLMAN: The distribution pattern of the pancreatic islet volume in normal and hyperglycemic mice. *Acta endocr. (Kbh.)* **36**, 609—616 (1961).

- HELLMAN, B., and B. PETERSSON: The activity of the islet B cells as indicated by the nuclear and nucleolar size in the American obese-hyperglycemic mice. *Acta path. microbiol. scand.* **50**, 291—296 (1960).
- HOTCHKISS, R. D.: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.* **16**, 131—141 (1948).
- LAZARUS, S. S., and S. A. BENCOSME: Development and regression of cortisone-induced lesions in rabbit pancreas. *Amer. J. clin. Path.* **25**, 1146—1156 (1956).
- LOGOTHETOPOULUS, J., and J. M. SALTER: Morphology and cytochemistry of alpha cells of the rabbit pancreas. *Diabetes* **9**, 31—37 (1960).
- MASKE, H.: Interaction between insulin and zinc in the islets of Langerhans. *Diabetes* **6**, 335—341 (1957).
- MAYER, J., S. B. ANDRUS and D. J. SILIDES: Effect of diethyldithiocarbamat and other agents on mice with the obese-hyperglycemic syndrome. *Endocrinology* **53**, 572—581 (1953).
- O'LEARY, J. L.: An experimental study of the islet cells of the pancreas in vivo. *Anat. Rec.* **45**, 27—58 (1930).
- PARAKKAL, P. F.: Mordanting fixation as a means of facilitating the staining of pancreatic cells of mouse. *Stain Technol.* **36**, 33—34 (1961).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*. London: J. & A. Churchill, Ltd. 1960.
- SOULAIRAC, A., et P. DESCLAUX: Activité phosphatasique des ilots de Langerhans du pancréas chez le rat normal et rendu diabétique par l'alloxane. *Ann. Endocr. (Paris)* **12**, 228—230 (1951).
- THIEL, A.: Über die Pankreasinseln normaler und diabetischer Fettmäuse. *Verh. anat. Ges. (Jena)* **55**, 251—258 (1958).
- TORSON, W. E.: Glycogen infiltration (so-called hydropic degeneration) in the pancreas in human and experimental diabetes mellitus. *Amer. J. Path.* **27**, 327—347 (1951).
- VOIGT, G. E.: Untersuchungen mit der Sulfidsilber-methode an menschlichen und tierischen Bauchspeicheldrüsen (mit besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus und experimenteller Metallvergiftungen). *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 295—323 (1959).
- WOLFF, H., u. D. RINGLEB: Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. *Z. ges. exp. Med.* **124**, 236—256 (1954).
- WRENSHALL, G. A., S. B. ANDRUS and J. MAYER: High levels of pancreatic insulin coexistent with hyperplasia and degranulation of beta cells in mice with the hereditary obese-hyperglycemic syndrome. *Endocrinology* **56**, 335—340 (1955).

Doz. Dr. Bo HELLMAN.

Histological Department, University of Uppsala, Uppsala, Sweden

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. HORSTMANN)

DAS EPITHEL DER TUBA UTERINA DES NEUGEBORENEN ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BEFUNDE

Von

H.-E. STEGNER

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1961)

Vielen Teilfunktionen der Tuba uterina stehen zumindest zwei lichtmikroskopisch annähernd charakterisierbare Zelltypen des Epithelverbandes gegenüber: Flimmerzellen und sekretorische Zellen. Das Tubenepithel des Neugeborenen zeigt unter dem Einfluß mütterlicher Oestrogene Sekretionsvorgänge, deren Morphologie im lichtoptischen Bereich nicht prinzipiell vom Sekretionsbild der Erwachsenen tube während der Geschlechtsreife abweicht. Flimmerzellen sind in voll ausgebildetem Zustande vorhanden, treten allerdings an Zahl noch zurück (SCHRÖDER 1930).

Wenn auf Grund dieser morphologischen Übereinstimmungen die vereinzelten Literaturfunde über den mikroskopischen Bau der frühkindlichen Tube durch einen Überblick über die histologischen und histochemischen Befunde an der Erwachsenentube ergänzt werden, so geschieht dies nur mit größtem Vorbehalt. Über den Sekretionsmodus der Epithelzellen bestehen noch keine eindeutigen Vorstellungen. Weder bei histologischen, noch bei histochemischen Untersuchungen menschlicher Tuben konnten mit Sicherheit Sekretvorstufen in Form korpuskulärer Elemente (Prosekretgranula) nachgewiesen werden. FREDRICSSON (1959) fand PJS-positives, diastase-resistentes Material diffus und lediglich in feingranulärer Form in den apikalen Anteilen des Zytoplasmas und frei im Tubenlumen. Auch die Flimmerzellen enthalten PJS-positive Substanzen, die sich jedoch bei Diastasebehandlung als Glykogen erweisen. Soweit mit lichtmikroskopischen Methoden erkennbar, erfolgt die Sekretabgabe entweder durch Ausstoßung eines fädig-körnigen Materials (büschelförmige Fäden: SCHAFFER 1928) oder unter Abschnürung der blasig oder keulenförmig aufgetriebenen apikalen Zellanteile (balloon-secretion: AGDUHR 1927), teilweise unter Einbeziehung der Zellkerne.

Innerhalb der Säugerreihe besteht eine Reihe artbedingter Variationen. BORELL, GUSTAVSON, NILSSON u. WESTMAN (1959) halten diese „Sekretionsphasen“ zum Teil für artefizielle Verunstaltung oberflächlicher Mikrovilli durch die histologische Präparation. Bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Rattentuben fanden sie keine vergleichbaren homologen Zellformen. Ebenso wenig waren Zellen nachweisbar, die sowohl Zilien als auch Sekretgranula enthielten. Als Sekretkörner werden submikroskopisch relativ elektronendichte, im allgemeinen von einer Membran umgebene runde Elemente angesehen, deren Durchmesser 0,2–1,0 μ und mehr betragen. In sekretorischen Zellen der Kaninentube sind sie in großer Anzahl teils über den Zelleib verstreut, teils in vorgewölbten apikalen Zellabschnitten konzentriert (NILSSON 1958, NILSSON u. RUTBERG 1960). Die Identifizierung dieser Plasmasubstanzen als Sekretgranula rechtfertigt nicht zuletzt ihr generelles Vorkommen mit morphologischen Abweichungen in anderen Sekretionsorganen (Pankreas, Submandibulardrüsen, Endozervikaldrüsen, Schleimdrüsen des Bronchialepithels und andere). Der

aus der Lichtmikroskopie übernommene Begriff des Sekretgranulum (insbesondere der „serösen“ Drüsenzelle) bedarf für submikroskopische Betrachtungen einer strengeren Definition. Die Bezeichnung findet bisher sowohl Anwendung auf korpuskuläre Elemente von Drüsenzellen, welche — intrazellulär und nach Ausstoßung — ihre färberischen, morphologischen und histochemischen Eigenschaften bewahren. Sie wird daneben in gleicher Weise auf granuläre Plasmabestandteile angewandt, welche vor ihrer Abgabe einen Gestalts- und Konstitutionswandel (Reifung) durchmachen oder überhaupt nicht mit dem definitiven Sekretionsprodukt identisch sind, sich aber in irgendeiner Form an der Sekretbildung substantiell beteiligen (supporting material).

Morphologische und histochemische Untersuchungen brachten noch keine endgültige Entscheidung, ob sich die Funktionen der Flimmerzellen auf Ziliokinetik beschränken oder gleichfalls sekretorische Aufgaben erfüllen. Apikale Blasenbildung (bleb formation) zilientragender Zellen wird von ALDEN (1942) als Anzeichen einer sekretorischen Leistung gedeutet; sie stützt die von ESPINASSE (1935) und SCHAEFFER (1928) vertretene Meinung einer Irrelevanz der Unterscheidung beider Zelltypen.

Bereits MOREAUX (1913), TSCHASSOWNIKOW (1914) und WESTMAN (1916) äußerten Zweifel an der Individualität und Formkonstanz der genannten Zellgrundtypen des Epithels. Übergangsphasen einer Zellart in die andere sind beschrieben worden (SCHAEFFER 1908, GUERRIERO 1929 u. a.). WALTER (1929) fand eine zentrale Geißel bei flimmerlosen Zellen. Die sog. Stift- oder Stäbchenzellen werden dagegen als Degenerationsformen angesehen, welche nach Ausstoßung aus dem Zellverband möglicherweise durch Ausdifferenzierung kleiner basal gelegener Elemente (intercalated cells) ersetzt werden.

Ein mit der Geschlechtsreife einsetzender zyklusabhängiger Formwandel, der allerdings nicht den Grundtypus der Zellelemente ändert, ist anerkannte Tatsache, wenn auch nicht in der von MOREAUX (1913) geäußerten Meinung einer in vier Phasen mit alternierender Bewimperung und Stoffabgabe ablaufenden Periodizität. Unsere gegenwärtigen Vorstellungen stimmen im grundsätzlichen mit der Ansicht SNYDERS (1924) überein, der beim Menschen anstelle eines periodischen Typenwandels (ciliated and non-ciliated phase) lediglich der Follikel- und Luteinphase korrelierte Wandlungen im Volumen (Zellhöhe) und in Sekretionsmaxima der zilienfreien Zellen beschrieb. Nach NOVAK und EVERETT (1928), SCHRÖDER (1930), TIETZE (1929) u. a. herrschen Flimmerzellen in der präovulatorischen Phase vor, während in der vierten Woche bis zur Menstruation die Sekretionszellen zunehmen. Obwohl in Analogie zum Endometrium die prämenstruelle Kongestion mit reichlicher Zellproliferation einhergeht, findet eine nennenswerte Zellabstoßung mit Epithelentblößung zur Zeit der Regel nicht statt. Nach den Beobachtungen von FREDRICSSON (1959a, b) bleibt die zahlenmäßige Relation beider Zellgrundtypen während der zyklischen Wandlungen und über die geschlechtsreife Phase der Frau annähernd konstant. Regionäre Unterschiede gibt es nach Mitteilung zahlreicher Untersucher innerhalb der abdominalen, ampulären und isthmischen Tubenabschnitte. Nach allen bisherigen Untersuchungen sind — analog den Vorgängen im Endometrium — die alternierenden Sekretionsmaxima und -minima dem ovariellen Zyklus korreliert, also Ausdruck einer ontogenetisch bedingten, gleichartigen Ansprechbarkeit auf bestimmte hormonelle Einwirkungen. Sekretorische Funktionen im Dienste der Ernährung der wandernden Eizelle, Ausbildung sekundärer Eihüllen, Auflösung der Zona pellucida usw. müßten erwartungsgemäß in ihren Höhepunkten mit dem Zeitpunkt der Passage des befruchteten Eies zusammenfallen. Für diese Annahme gibt es bisher

am menschlichen Untersuchungsgut keine überzeugenden Hinweise. Eine Ruhephase als Ausgangsbasis morphologischer Untersuchungen ist bei einem sich rhythmisch wandelnden Epithel nicht streng definierbar. Die Ausbildung der Berufsstrukturen beginnt mit dem Zeitpunkt der Ansprechbarkeit der kranialen Abschnitte des Müllerschen Epithels auf einen speziellen weiblichen Wirkstoff oder ausbalancierten Stoffkomplex, welcher die Differenzierung des Epithels — entsprechend seinem genetischen Determinismus — zur definitiven Tubenschleimhaut auslöst. Dieser Prozeß ist beim neugeborenen Mädchen weitgehend vollendet.

Material und Methoden

Die untersuchten Tuben stammen von zwei reifen Neugeborenen und einem frühgeborenen Kind von 45 cm Länge; sie wurden innerhalb 1 Std nach dem Tode bzw. Geburt entnommen. Die nachfolgenden Beschreibungen betreffen das Epithel im ampullären Bereich. Das Material wurde in einer isotonen (NaCl) und auf p_H 7,2 gepufferten (Veronalazetat) 1%igen OsO_4 -Lösung bei 4° C 2 Std lang fixiert. Einbettung erfolgte über Äthanol und Azeton in Methyl-Butyl-Methacrylat 1:3. Die Ultradünnschnitte wurden auf einem Leitz-Mikrotom (Fernandez Morán) hergestellt, die Aufnahmen mit einem Siemens Elmiskop I bei 80 kV gemacht. Plattenmaterial: Perutz Kontrast und Elektrogil (Guilleminot, Paris).

Befunde

Die relative Insuffizienz der zur Zeit gebräuchlichen Fixationsmittel für die Elektronenmikroskopie offenbart sich besonders bei der Behandlung der durch großen Flüssigkeitsreichtum charakterisierten fetalen und frühkindlichen Gewebe. Der Erhaltungszustand ist trotz sorgfältiger Pufferung und Verwendung frischen Materials wenig befriedigend. Die Binnenstrukturen der Zellen sind im allgemeinen sehr locker, das Zytoplasma häufig nahezu „optisch leer“. Die Mitochondrien sind maximal blasig aufgetrieben, die Cristae mitochondriales auf stummelförmige Reste reduziert. Da sich diese vesikuläre Umgestaltung jedoch nicht generell auf andere geschlossene lamelläre Organellen (Golgi-Material, Ergastoplasma) erstreckt, kann die Mitochondrienschwellung mit Vorbehalt auch als Ausdruck eines funktionellen Ödems gedeutet werden (Enzymabgabe s. DOUNCE et al. 1955). Ähnliche Bilder sind auch von verschiedenen resorptiven Zellen nach großen Flüssigkeitsangeboten bekannt (RUSKA 1960: Darmepithelien). Die hydropische Degeneration der Mitochondrien führt besonders in den Flimmerzellen teilweise unter Schwund der Mitochondrienmatrix (clear swelling: ROULLIER 1960), Reduktion der Cristae und der umhüllenden Membransysteme zur großblasigen Vesikulation.

Die epithelialen Zellen stehen in streng geschlossenem Verband (Abb. 1). Die Grenzmembranen laufen in engem Kontakt parallel zueinander. Stärkere Verzahnung ist nicht zu beobachten, auch keine Dissoziation oder gröbere interzelluläre Spaltbildung. Desmosomen finden sich mit Regelmäßigkeit in den lumennahen Zellabschnitten (Schlußleisten: SCHAFFER 1927, VOGEL 1957) sowie unregelmäßig verstreut im Bereich der übrigen seitlichen zellulären Kontaktflächen. Eine zarte Basalmembran begrenzt den Epithelverband gegen breite, parallel angeordnete subepitheliale Fibrillenbündel mit charakteristischer Querstreifung. Den augenfälligsten Typ unter den verschiedenen Formen der epithelialen Zellpopulation stellen die Flimmerzellen dar. Beim Neugeborenen bilden sie die Minderheit. Sie stehen einzeln oder in kleinen Gruppen und besitzen in

der Mehrzahl der Fälle großvesikuläre Strukturen im supranukleären und apikalen Bereich. Die Kerne sind rundlich oder oval, leicht gebuchtet, locker strukturiert mit (gewöhnlich) einem gut konsolidierten Nukleolus und weiteren, häufig membranhaften, mehr oder weniger dichten granulären Aggregaten. Im Zelleib verstreut, finden sich vorwiegend supranukleär unorganisierte α -Zytomembranen und blasige Mitochondrien. In diesem Bereich liegen auch neben charakteristi-

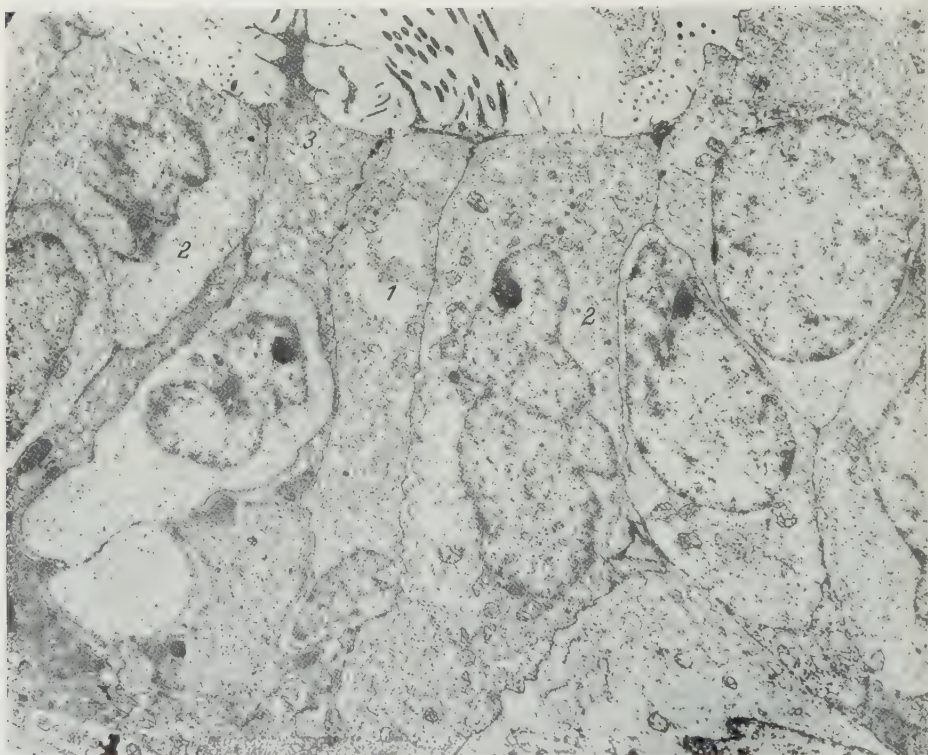


Abb. 1. Tubenepithel eines reifen Neugeborenen. Übersicht. 1 Flimmerzelle; 2 sog. „sekretorische“ Zellen mit spärlichen oberflächlichen Mikrovilli; 3 sekretorische Zelle mit Ansammlung von granulärem Material innerhalb baumartig verästelter zytoplasmatischer Ausstülpungen. Vergr.: 4600fach

sehen groben Lipideinschlüssen runde, elektronendichte, membranfreie Granula mit einem Durchmesser von $0,2-1,0 \mu$ (Abb. 2). Die Flimmerhaare zeigen keine Abweichungen vom einheitlichen Strukturplan der Kinozilien (s. FAWCETT u. PORTER 1954, NILSSON 1957, ODOR 1953). Die in einem Kreis um das zentrale Fibrillenpaar angeordneten neun Fibrillen sind im Zytoplasma verankert. Das sog. Zentralkörperchen wird durch eine sanfte zirkuläre Ausweitung des von den Filamenten geformten gleichmäßigen Zylinders gebildet. Proximal von dieser Anschwellung verjüngt sich der Fibrillenstrang und senkt sich gabelartig mit zwei Wurzelfibrillen in das Zytoplasma (Abb. 3). Das zentrale Fibrillenpaar endet oberhalb der Basalkörper. Auf Querschnitten der Zilien erkennt man gelegentlich eine von der „Radnabe“ zu den peripheren Fibrillenpaaren ziehende Speichenstruktur. Auf diese Weise erfolgt eine zentrale Verankerung und Verstrebung der kreisförmig angeordneten Filamente. Die Außenmembran der Fibrillen geht kon-

tinuierlich in die oberflächliche Zellmembran über. In verschiedenen Fällen beobachteten wir den Flimmersaum invertiert und unter das Niveau der Epitheloberfläche verlagert. Solche Bilder können das Resultat unglücklicher Schnittführung sein, entstehen jedoch häufig durch Retraktion von Flimmerzellen zur Epithelbasis (prämitotische Abrundung) oder durch Einkeilung isolierter, am Grunde von Schleimhautbuchten stehender Flimmerzellen. Die durch steile Ein-

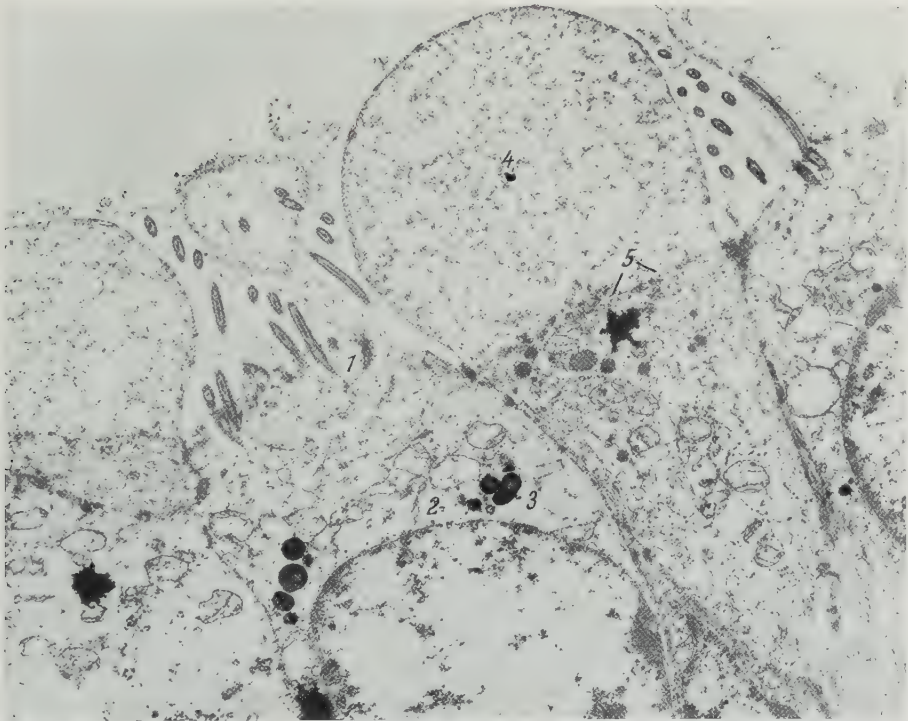


Abb. 2. Apikale Anteile von zilientragenden und „sekretorischen“ Zellen aus dem Tubenepithel eines reifen Neugeborenen. 1 Zillie mit basal verankerter, periodisch gegliedelter Wurzelfibrille; 2 hydropische Mitochondrien und Bläschen in der supranuklearen Zone; 3 paraplasmatische Inklusionen (opaque granules); 4 keulenförmig in das Lumen vorgewölbte apikale Zellanteile mit lockerer Binnenstruktur ohne erkennbare Sekretionsprodukte; 5 intraplasmatisches Plasmalemm in Formation. Vergr. 8000fach

faltung bedingte apikale Annäherung der Nachbarzellen kann zum Zellkontakt und möglicherweise zum Verbund führen, so daß die dazwischengelagerte Flimmerzelle von der Oberfläche abgeschnitten wird. Solche Vorgänge sind im dynamischen Verbands des Epithels im Gefolge peristaltischer, fluktuierender Faltungsprozesse und Volumenschwankungen benachbarter Zellen unschwer vorstellbar. Wir haben keine Bilder gefunden, die vorbehaltlos den von v. MIHÁLIK (1934, 1934/35) beschriebenen Flimmerblasen mit konzentrisch gerichtetem kontinuierlichem Flimmerbelag in Parallele gesetzt werden könnten. Nach den Beobachtungen von v. MIHÁLIK gehen die Flimmerzellen aus den sog. Ersatzzellen, kleinen, meist dreieckig erscheinenden Zellen in der basalen Schicht des Epithels, hervor. Die Flimmerblase ist eine ursprünglich intrazellulär gelegene Bildung, welche nach dem Zellapex verlagert wird und sich dort unter Bildung einer neuen Oberflächenbedeckung öffnet.

Das Hauptkontingent der Zellen ist cilienfrei. Es stellt offenbar einen einheitlichen Zelltyp dar mit funktionsabhängigen morphologischen Varianten, die insbesondere die Oberflächengliederung betreffen. Gemeinsame Kennzeichen dieser

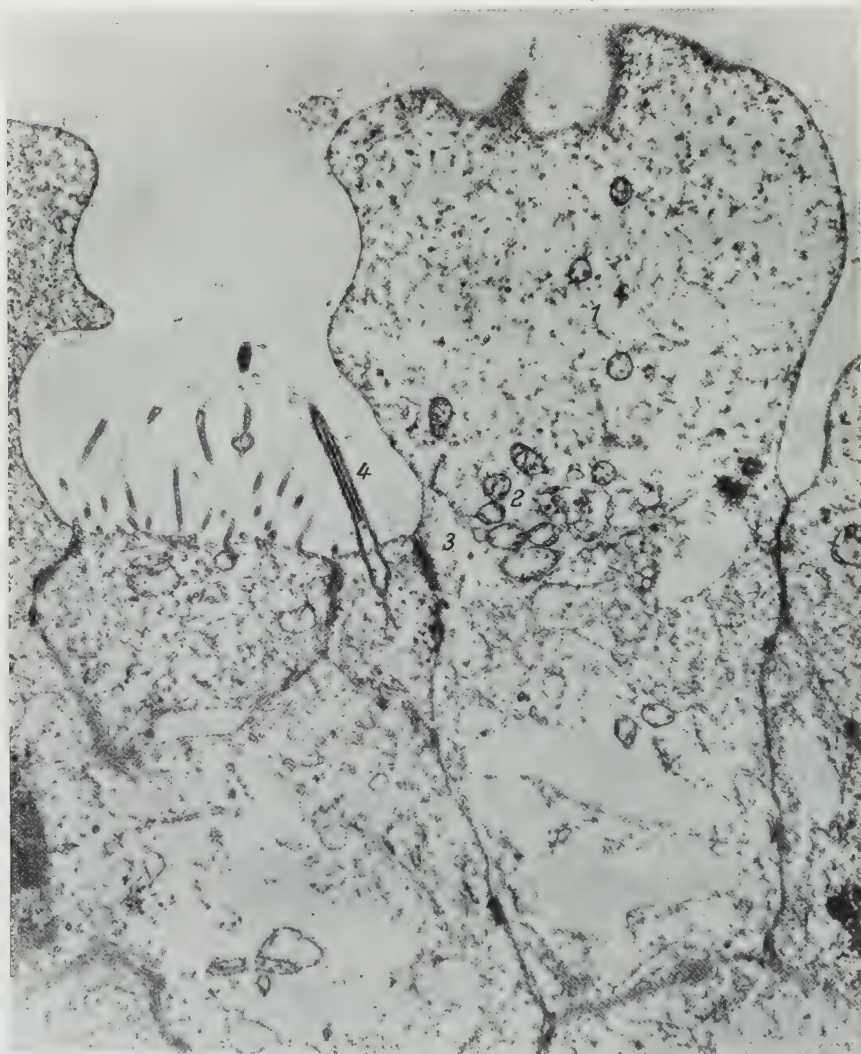


Abb. 3. Tubenepithel eines Neugeborenen. 1 „sekretorische“ Zelle mit vorgewölbtem hydropischen Zellapex; 2 Aggregation von Mitochondrien, Bläschen und Lamellen als Vorbereitungsphase zur Ausbildung eines intraplasmatischen Plasmalemm; 3 Desmosom; 4 Zilie mit Zentralfibrillen und zwei gabelartigen Wurzelfibrillen unterhalb des sog. Basalknötchens. Vergr.: 10000fach

Zellen sind die lockere Zytoplasmastruktur mit dissoziierten Paladegranula, einzelnen α -Zytomembranen und gruppierten, mäßig gequollenen Mitochondrien: die Quellung letzterer erreicht selten den Grad hydropischer Degeneration, den die ziliennahen Mitochondrien der Flimmerzellen aufweisen. Auch die Kerne enthalten aufgelockerte Strukturen mit randständiger Konzentration körnigen Materials und einen gewöhnlich exzentrisch gelegenen Nukleolus. Stellenweise

ist die Kernmembran gewellt oder stärker gebuchtet. Die Zelloberfläche ist im Regelfalle geradlinig begrenzt und lediglich durch einzelne plumpe oder zarte Mikrovilli gegliedert.

Eine größere Anzahl der Zellen zeigt jedoch deutlich morphologische Kriterien einer gerichteten Substanzabgabe. Es bleibt zunächst dahingestellt, ob es sich dabei um spezifische Sekrete oder um die Exkretion von Zellmaterial handelt.



Abb. 4. Tubenepithel eines reifen Neugeborenen. 1 Flimmerzellen; 2 hochgradig hydropisch gequollene vesikuläre Mitochondrien unterhalb der Basalkörperchenreihe; 3 Lipide; 4 paraplasmathe Inklusionen; 5 Konzentration granulären Materials (emittierte chromosomale Substanzen?) in vorgewölbten und fingerförmig ausgestülpten Zellanteilen; 6 intraplasmatisches Plasmalemm in Formation im Bereich der künftigen Abschnürungsstelle. Vergr.: 4600fach

Weniger nach dem Modus der Elimination als nach der Beschaffenheit des abgegebenen Materials lassen sich zwei Typen unterscheiden. In einem Falle sind die Zellen durch Reichtum an Paladegranula charakterisiert. Sie stehen als dunkler Typ im Kontrast zu den im allgemeinen flüssigkeitsreichen „hellen“ Epithelzellen. Das zur Ausscheidung vorgesehene Material besteht aus groben, kontrastreichen Körnchen von unterschiedlicher Größe und Dichte, die in ihrer submikroskopischen Beschaffenheit den Ribonukleingranula weitgehend ähneln und in vorgewölbten apikalen Zellbezirken angereichert werden (Abb. 4, 5). Unterhalb dieser Konzentrate kommt es durch Ausrichtung des endoplasmatischen Retikulums zur Demarkation und schließlich zur Separation der oberen Zellabschnitte. Die lumennahen Plasmabezirke, die bei dieser „apokrinen“ Form der Substanzabgabe von der Zelle getrennt und abgestoßen werden, sind lediglich Sammelorte

der ubiquitär im Zytoplasma vermehrt nachweisbaren Granula. Von histochemischen Untersuchungen ist ein Beitrag zur Lösung der Frage zu erwarten, ob es sich ursprünglich um kerneigene emittierte Substanzen handelt. Der Abtrennung

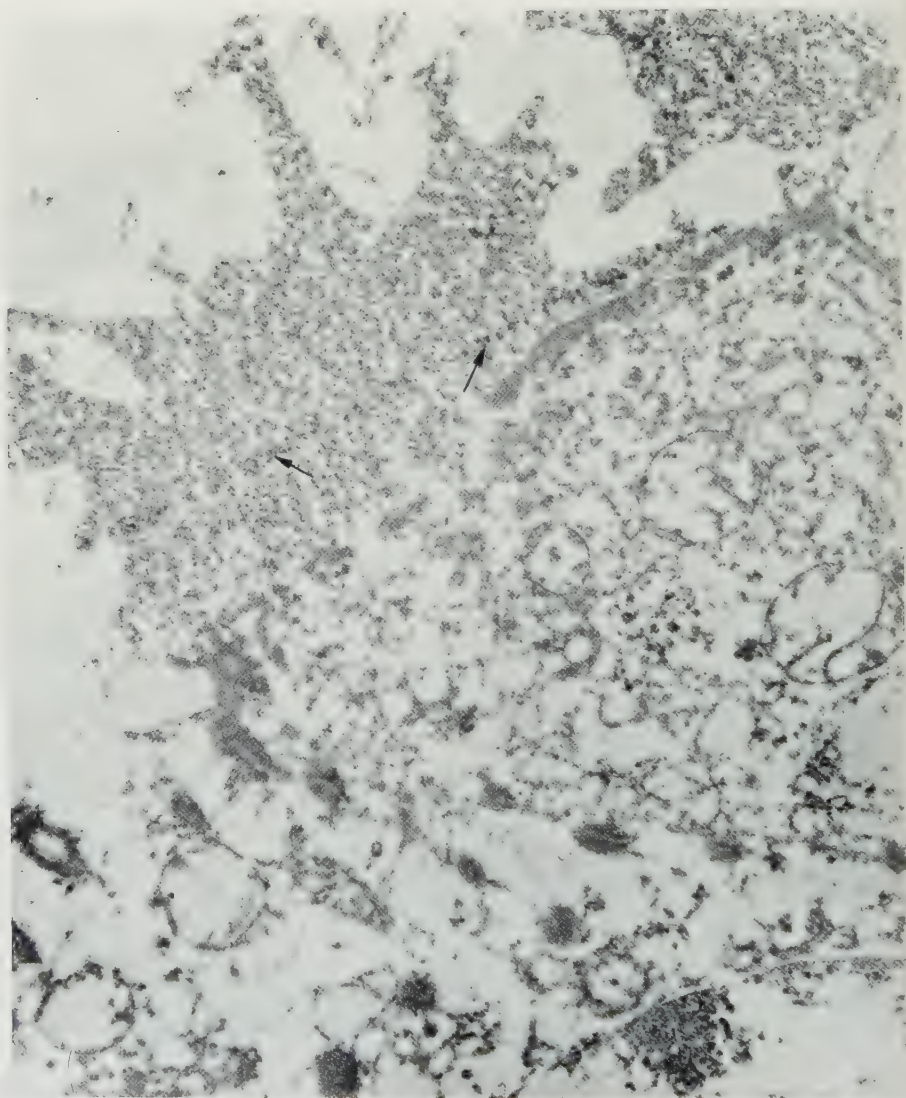


Abb. 5. Ausschnitt aus Abb. 4. Demarkationszone zwischen Zellkörper und dem zur Abstoßung vorgesehenen Zellapex mit angereichertem granulärem Material. Bei \Rightarrow eine Scharte. Vergr.: 26 000fach

können auf diese Weise relativ große Zytoplasmabezirke zum Opfer fallen (Abb. 4), sie kann sich aber auch auf schmale fingerförmige zytoplasmatische Ausstülpungen beschränken, die nach Anreicherung körnigen Materials bizarre, baumartig verzweigte Gestalt annehmen und vermutlich den lichtmikroskopisch beobachteten „büschelförmigen Fäden“ entsprechen (Abb. 6, 7).

Ähnliche spontane Amputationen der apikalen Zellanteile nach Ausbildung eines intraplasmatischen Plasmalemmes kennzeichnen einen weiteren Zelltyp innerhalb des Epithelverbandes. Er entspricht den lichtmikroskopisch erkenn-

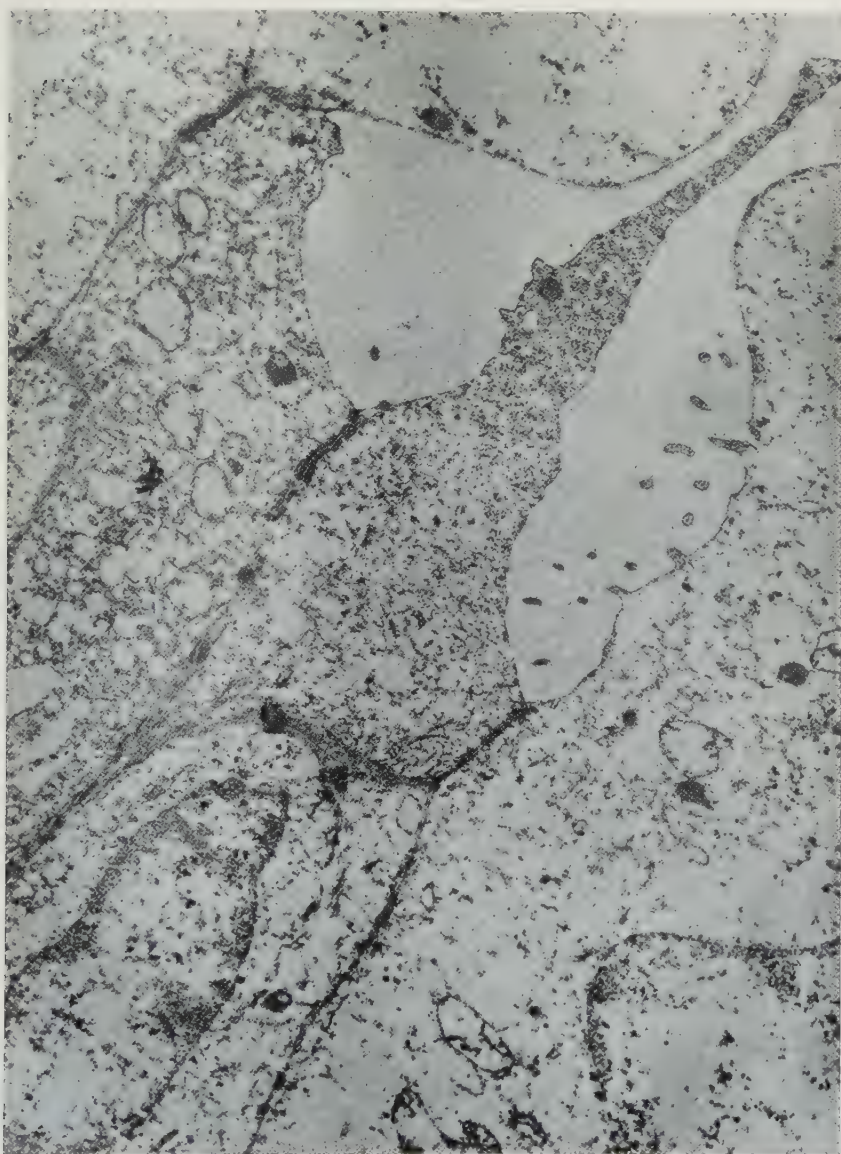


Abb. 6. Zipflig in das Lumen ausgestülpter Zytoplasmafortsatz mit angereicherten granulären Substanzen einer „sekretorischen“ Zelle des Tubenepithels. Vergr.: 12000fach

baren Zellen mit „balloon secretion“ oder „bleb formation“. Große, ödematöse Plasmaanteile mit lockerer Binnenstruktur, spärlichen dissoziierten Granula, einzelnen Bläschen und vesikulären Mitochondrien wölben sich zum Teil keulenförmig in das Lumen vor (Abb. 2, 3). Die Zellmembran ist gespannt, zuweilen

auch gebuchtet (Abb. 8). Die Form der Gebilde spricht für eine Ansammlung größerer Flüssigkeitsmengen. Für die Konzentration oder Speicherung irgendwelcher Sekrete oder Sekretvorstufen findet sich in diesem Bereich kein morphologischer Anhalt. Ebenso wenig erkennt man umschriebene, unregelmäßig begrenzte kontrastarme Felder, wie sie von BORELL, GUSTAVSON, NILSSON und WESTMAN (1959) sowie WESSEL (1960) als Speicherstätten von Glykogen im Endometrium beschrieben wurden. Die exzessiv ödematösen apikalen Zellbezirke demarkieren

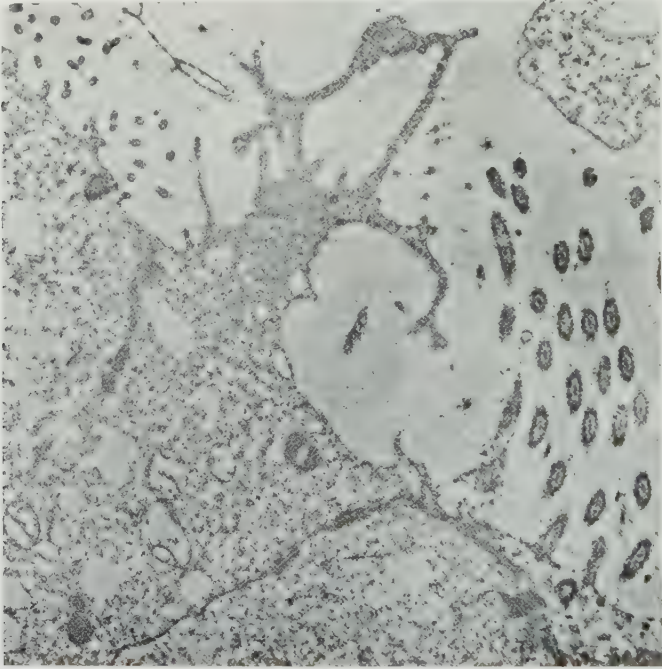


Abb. 7. „Sekretorische“ Zelle aus dem Tubenepithel eines Neugeborenen mit Ansammlung granulären Materials in baumartig verästelten zytoplasmatischen Ausstülpungen (analog den sog. „büschelförmigen Fäden“ bei lichtmikroskopischer Betrachtung). Vergr.: 12000fach

sich gegen das übrige Zytoplasma durch gerichtete Formation lamellärer Systeme des endoplasmatischen Retikulums. Die Abtrennung beginnt mit einer regellosen Ansammlung von Mitochondrien, Bläschen und einigen Zytomembranen im Grenzbereich (Abb. 3). Die lamellären Strukturen richten sich transversal aus und ergänzen sich zum kontinuierlichen „intraplasmatishen Plasmalemm“ (Abb. 2). Solche abgeschnürte rundliche Zytoplasmaanteile liegen stellenweise in großer Zahl frei im Lumen in unmittelbarer Nachbarschaft der Epitheloberfläche. Freie Mitochondrien, Bläschen und Lipoidkörper sind weitere Bestandteile des reichlich in der Tubenlichtung angehäuften Zelldetritus (Abb. 9).

Diskussion

Mit höherer Auflösung wächst die Zahl der optisch faßbaren zellulären Teilstrukturen. Um so deutlicher wird gleichzeitig die unterschiedliche Ansprechbarkeit der Zellindividuen und ihrer Organellen — innerhalb eines gemeinhin uniform erscheinenden Epithelverbandes — auf bestimmte endogene Stimulationen bzw.

exogene physikalisch-chemische Einwirkungen. Funktionsphasen im Lebensablauf der einzelnen Zelle treten klarer hervor. Die Vielzahl der neu hinzugekommenen sichtbaren Details erschwert eine Typisierung der Zellelemente. Die Flimmerzellen

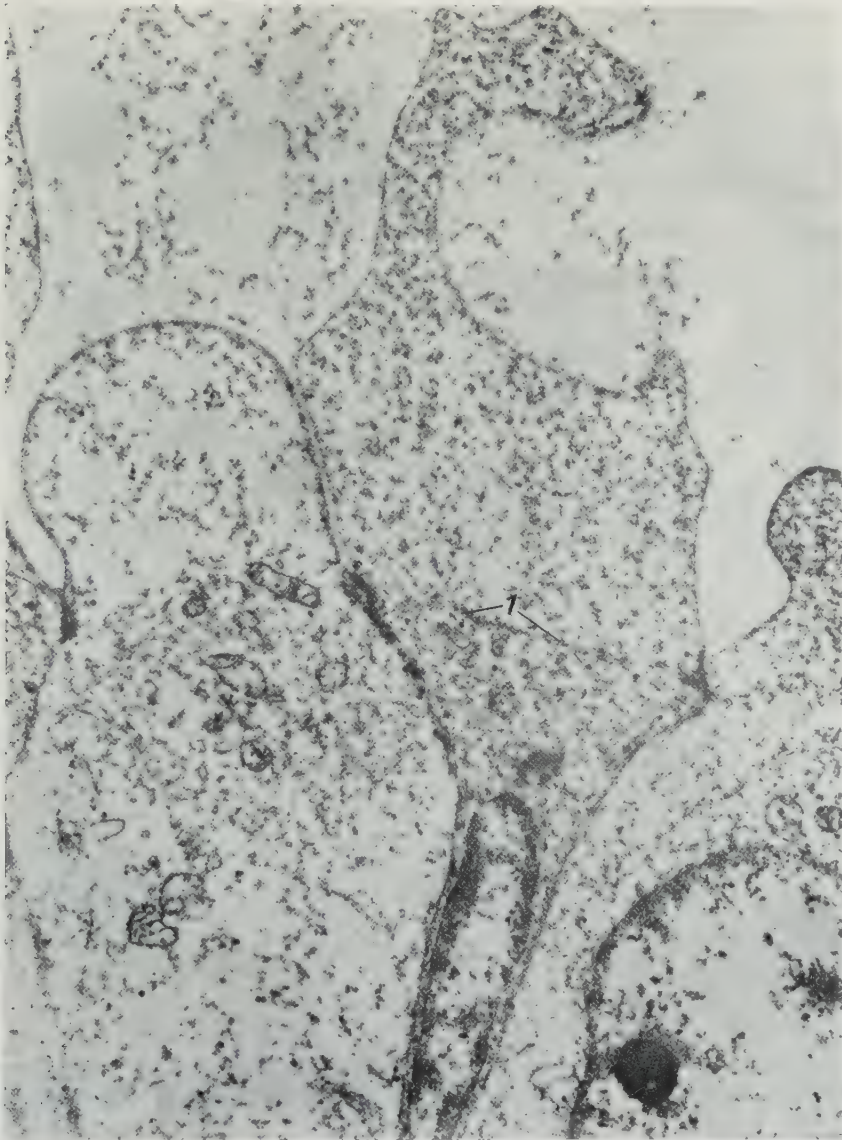


Abb. 8. „Sekretorische“ Zelle aus dem Tubenepithel eines Neugeborenen mit vorgewölbtem gebuchtetem Zellapex. 1 Intraplastisches Plasmalemma in Bildung. Vergr.: 14000fach

sind durch Zilien und Zusatzeinrichtungen im Dienste der Ziliokinetik hinreichend charakterisiert. Die Konzentration von Mitochondrien unmittelbar unter der Reihe der Basalkörperchen ist ein in allen Flimmerzellen anzutreffendes Merkmal, das mit der hohen Stoffwechselaktivität dieses Bezirkes in Zusammenhang

gebracht wird. Die hydropische Umgestaltung und Vesikulation dieser Mitochondriengruppen können reversible, funktionsabhängige Veränderungen sein, zumal die Nachbarzellen gut erhaltene oder nur wenig gequollene Mitochondrien aufweisen; sie sind jedoch nach unserer Meinung — wenigstens teilweise — Folge fixationsbedingter Anisotonie. Große opake, membranfreie Granula bereichern

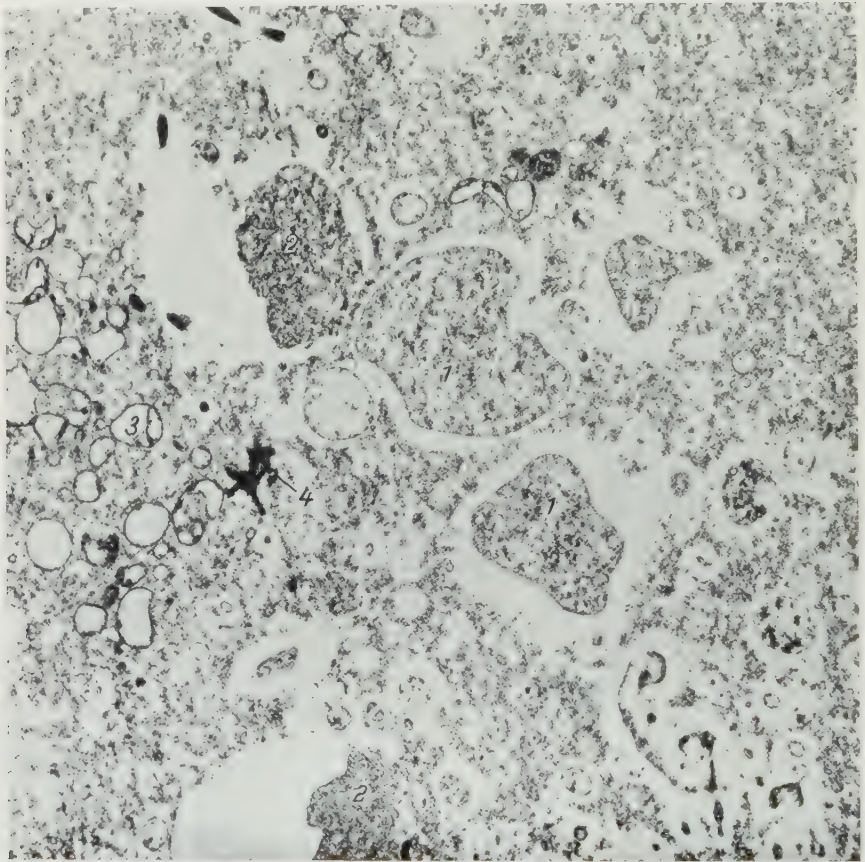


Abb. 9. Zelldetritus im Lumen der Tube eines Neugeborenen. 1 Abgeschnürte hydropische Plasmaanteile; 2 abgeschnürte Plasmaanteile mit granulären Konzentraten; 3 vesikulöse und hydropisch degenerierte ausgeschleuste Mitochondrien; 4 Lipoidmaterial. Vergr. 10 000fach

die supranukleare Zone der Flimmerzellen. Sie sind homogen, gelegentlich in den Randabschnitten verdichtet. Es besteht keinerlei Rechtfertigung, sie als Sekretgranula anzusprechen. Nur mit größter Vorsicht lassen sich auf Grund struktureller Homologie Vermutungen über die Natur dieser Gebilde anstellen. RHODIN u. DALHAMN (1956) beschreiben etwa entsprechende Bildungen (large opaque granules) in schleimproduzierenden Zellen des Bronchialepithels. Ihre Häufigkeit stand in umgekehrtem Verhältnis zur Zahl der Sekretgranula. Die Autoren fanden die Grundsubstanz dieser Granula teils homogen, teils in Form einer regelmäßigen kristalloiden Binnenstruktur geordnet. Morphologisch verwandte Strukturen sind in den Dotterpartikeln verschiedener Echinodermen, Mollusken und Amphibien nachgewiesen worden (BOLOGNARI 1960, KARASAKI 1958, WISCHNITZER

1957). Darin kommt möglicherweise eine Ähnlichkeit im chemischen Aufbau zum Ausdruck und damit eine analoge Bedeutung als paraplasmatische Reservesubstanz.

Überblickt man die morphologischen Befunde an den zilienfreien Zellen der Neugeborententube, so finden sich eindeutig Zeichen einer zellulären, *gerichteten Substanzabgabe*, die in jedem beobachteten Falle mit der Abstoßung mehr oder weniger großer organisierter Zytoplasmabezirke einhergeht. Erfolgt die Abstoßung nach apikaler Anreicherung körnigen Materials (Abb. 4, 5), so sind mit Fug und Recht die morphologischen Kriterien einer apokrinen Sekretionsleistung der Zelle erfüllt, soweit man sich den Begriffsbestimmungen von SCHIEFFER-DECKER (1917) u. CHÈVREMONT (1956) anschließt (s. Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie von BARGMANN, FLEISCHHAUER u. KNOOP 1960), ohne daß damit das Elektronenmikroskop Auskunft über die Natur des sezernierten Materials geben könnte. Im Gegensatz zu diesen Befunden geht die Ablösung der strukturarmen, ödematösen Plasmaanteile (Abb. 2, 8) unabhängig von der Gleichartigkeit des Abgabemodus nicht mit der Ausstoßung eines morphologisch faßbaren speziellen Zellproduktes einher. WETZSTEIN u. WAGNER (1960) beschrieben kürzlich im Endometrium einer geschlechtsreifen Frau ähnliche Abschnürungen von apikalem Zytoplasma im Bereiche der Drüsenepithelien einer Schleimhaut in proliferativer Phase. Auch sie betonen die auffallend eintönig granulierten Zytoplasmazeichnung dieser Bezirke. Die Vorgänge lassen unter anderem folgende konkurrierende Deutungen zu:

a) Es handelt sich um apokrine Sekretion eines sehr feine Partikel enthaltenden hochdispersen Materials, das im angewandten optischen Auflösungsbereich nicht faßbar ist bzw. der histologischen Präparation zum Opfer fiel.

b) Die Abgabe organisierter Zytoplasmaanteile ist lediglich Ausdruck der für die untersuchte Lebensphase charakteristischen hohen Proliferationsrate (Zellmauserung).

c) Die Vorgänge sind im Sinne der „Klasmozytose“ (RANVIER) zu deuten. Die Abschnürung von Plasmateilchen dient als Nahrungsmaterial zum weiteren Aufbau anderer Zellen. MAXIMOV (1927) hat derartige Beobachtungen als Artefakte angesehen. Es ist interessant, daß in jüngster Zeit PETRY (1961) ähnliche Abschnürungsprozesse an Fibrozyten von Katzeineihäuten beobachten konnte. Ein Teil der losgelösten Plasmateilchen enthielt chromosomale mit Methylgrün-Pyronin positiv reagierende Substanzen! Diese Beobachtung hat eine bemerkenswerte Parallele zu unseren Vermutungen, daß es sich bei dem apikal angereicherten Material in den Tubenepithelzellen um emittiertes Kernmaterial handeln könnte. Nach den bisherigen morphologischen Kenntnissen würden sich die Sekretionsvorgänge im menschlichen Tubenepithel demzufolge auf die Abgabe zell- und kerneigener, zum Teil organisierter oder weitgehend „aufgeschlossener“ Substanzen beschränken, die den alimentären Ansprüchen der befruchteten Eizelle genügen.

Eine Stellungnahme zur Frage nach etwaigen metaplastischen Vorgängen innerhalb des Tubenepithels lediglich auf Grund anatomischer Beobachtung und Deskription ist wenig erfolgversprechend, zumal die Suche nach Übergangsphasen (transitional cells) einer Zellart in die andere die Konzeption einer *direkten* Metaplasie voraussetzt. Erwartungsgemäß dürften jedoch Verschiebungen in der

zahlenmäßigen Relation beider Haupttypen entweder im Gefolge einseitig überwiegender Zuwachs- oder Degenerationsrate auftreten oder im Rahmen einer *indirekten* Metaplasie aus pluripotenten Zellstufen bzw. aus differenzierten Zellindividuen nur nach vorübergehender Aufgabe der Berufsstrukturen.

Summary

An electron microscopical study of the epithelium of the uterine tube was carried out in the newborn. Among the epithelial cells at least two morphologically well defined types can be distinguished: ciliated and non-ciliated cells.

The ultrastructure of the cilia and related structures corresponds to what has been described by other authors in ciliated cells of various organs and of different species. Near the basal bodies of the cilia there is a concentration of vesicular mitochondria, which is thought to be evidence of a high metabolic activity in this region of the cell. Large opaque granules in the supranuclear zone of the ciliated cells are, it is suggested, paraplasmatic inclusions, perhaps supporting material for the ciliokinetic processes. There was no evidence of a secretory function of the ciliated cells.

Among the non-ciliated cells, which in general show a straight lined luminal border with few microvilli, there are some cells containing dense granules, which are distributed throughout the cytoplasm and concentrated in the luminal side of the cell. The apical parts of these cells are protruding and sometimes digitated or branched; they contain accumulated granular materials and are separated from the rest of the cell after the formation of an intracellular plasmalemma. A similar detachment was found in an other cell type, but here the protruded apical parts of the cells are edematous and do not contain any visible secretory materials. It is uncertain if the detached cytoplasmic substances form a part of a specific secretory product; there are no secretory granules within the cytoplasm. On the contrary, the detachment of cytoplasmic parts may only accompany the excessive proliferation of cells which takes place during this period of growth.

Literatur

- AGDUHR, E.: Studies on the structure and development of the bursa ovarica and the tuba uterina in the mouse. *Acta zool. (Stockh.)* **8**, 1—133 (1927).
- ALDEN, R. H.: The oviduct and egg transport in the Albino rat. *Anat. Rec.* **84**, 137—170 (1942).
- ALLEN, E.: The oestrus cycle in the mouse. *Amer. J. Anat.* **30**, 297—371 (1922).
- BARGMANN, W., K. FLEISCHHAUER u. A. KNOOP: Über die Morphologie der Milchsekretion II. (Zugleich eine Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie.) *Z. Zellforsch.* **53**, 545—568 (1961).
- BOLOGNARI, A.: Osservazioni al microscopio elettronico sui globuli vitellini degli ovociti dei Molluschi e degli Echinodermi. *Atti Soc. Peloritana Sci. fis. mat. nat.* **6**, 55—71 (1960).
- BORELL, U., K. H. GUSTAVSON, O. NILSSON and A. WESTMAN: The structure of the epithelium lining the Fallopian tube of the rat in oestrus. *Acta gynaec. obstet. scand* **38**, 203—210 (1959).
- CHÉVREMENT, M.: *Notions de cytologie et histologie*. Liège: Desoer 1956. Zit. nach BARGMANN, FLEISCHHAUER u. KNOOP 1961.
- DOUNCE, A. L., R. F. WITTER, K. J. MONTI, S. PATE and M. A. COTTONE: A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of cell nuclei. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 139—153 (1955).

- ESPINASSE, P. G.: The oviductal epithelium of the mouse. *J. Anat. (Lond.)* **69**, 363—369 (1935).
- FAWCETT, D. W., and K. PORTER: A study of the fine structure of the ciliated epithelia. *J. Morph.* **94**, 221 (1954).
- FREDRICSSON, B.: Histochemical observations on the epithelium of human Fallopian tubes. *Acta obstet. gynec. scand.* **38**, 109 (1959).
- Studies on the morphology and histochemistry of the Fallopian tube epithelium. *Acta anat. (Basel) Suppl.* **37** zu Bd. **38** (1959).
- GUERRIERO, C.: Sur la structure de l'épithélium de la trompe utérine pendant la période folliculaire et luteinique de l'ovaire. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **102**, 1074—1076 (1929).
- KARASAKI, S., and T. KOMODA: Electron micrographs of a crystalline lattice structure in yolk platelets of the amphibian embryo. *Nature (Lond.)* **181**, 407 (1958).
- LINARI, G.: *Zit. nach R. SCHRÖDER.*
- MAXIMOW, A.: Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. II/1. Berlin: Springer 1927.
- MIHÁLIK, P. v.: Über die Bildung des Flimmerapparates im Eileiterepithel. *Anat. Anz.* **79**, 259—268 (1934/35).
- Die Bildung des Flimmerapparates im Eileiterepithel des Menschen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **36**, 459—463 (1934).
- MOREAUX, R.: Recherches sur la morphologie et la fonction glandulaire de l'épithélium de la trompe utérine chez les mammifères. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **14**, 515—576 (1913).
- NILSSON, O.: Observations on a type of cilia in the rat oviduct. *J. ultrastruct. Res.* **1**, 170—177 (1957).
- Electron microscopy of the Fallopian tube epithelium of rabbits in oestrus. *Exp. Cell Res.* **14**, 341—354 (1958).
- NILSSON, O., and U. RUTBERG: Ultrastructure of secretory granules in post ovulatory rabbit oviduct. *Exp. Cell Res.* **21**, 622—625 (1960).
- NOVAK, E., and H. S. EVERETT: Cyclical and other variations in the tubal epithelium. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **14**, 499—530 (1928).
- ODOR, D. L.: Electron microscopy of rat oviduct. *Anat. Rec.* **115**, 434 (1953).
- PETRY, G.: Histotopographische und cytologische Studien an den Embryonalhüllen der Katze. *Z. Zellforsch.* **53**, 339—393 (1961).
- RHODIN, J., and T. DALHAMN: Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z. Zellforsch.* **44**, 345—412 (1956).
- ROUILLER, C.: Changes in mitochondrial morphology. *Int. Rev. Cytol.* **9**, 227—292 (1960).
- RUSKA, C.: Die Zellstrukturen des Dünndarmepithels in ihrer Abhängigkeit von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit des Darminhaltes. *Z. Zellforsch.* **52**, 748—777 (1960).
- SCHAFER, J.: Über Bau und Funktion des Eileiterepithels beim Menschen und bei Säugetieren. *M Schr. Geburtsh. Gynäk.* **28**, 526—542 (1908).
- Das Epithelgewebe. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORFF, Bd. 2, S. 35. Die Verbindung der Epithelzellen. Berlin: Springer 1926.
- *Lehrbuch der Histologie u. Histogenese*. 3. Aufl. Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1933.
- SCHIEFFERDECKER, P.: Siehe SCHAFER 1926.
- SCHRÖDER, R.: Der Eileiter. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORFF. Berlin: Springer 1930.
- SNYDER, F. F.: Changes in the human oviduct during the menstrual cycle and pregnancy. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **35**, 141—146 (1924).
- TIETZE, K.: Zur Frage nach den zyklischen Veränderungen des menschlichen Tubenepithels. *Zbl. Gynäk.* **53**, 32—38 (1929).
- TSCHASSOWNIKOW, S.: Über Becher- und Flimmerzellen und ihre Beziehungen zueinander. Zur Morphologie und Physiologie der Zentralkörperchen. *Arch. mikr. Anat.* **89**, 150—174 (1914).
- VOGEL, A.: Zelloberfläche und Zellverbindungen im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. 41. Tagg Dtsch. Ges. für Path.* 1957.
- WALTER, L.: Zur Kenntnis der flimmerlosen Epithelzellen der menschlichen Tubenschleimhaut. *Anat. Anz.* **67**, 138—144 (1929).

- WESSEL, W.: Das elektronenmikroskopische Bild menschlicher endometrialer Drüsenzellen während des mensuellen Zyklus. *Z. Zellforsch.* **51**, 633—657 (1960).
- WESTMAN, A.: Secernierende Zellen im Epithel der Tubae uterinae Fallopii. *Anat. Anz.* **49**, 335—342 (1916).
- WETZSTEIN, R., u. H. WAGNER: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am menschlichen Endometrium. *Anat. Anz.* **108**, 362—375 (1960).
- WISCHNTZER, S.: The ultrastructure of yolk platelets of amphibian oocytes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 1040—1042 (1957).

Dr. HANS-EGON STEGNER,
Frauenklinik d. Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf,
Martinistr. 52

Travail de l'Institut d'Anatomie et d'Histologie Pathologique de l'Université Médicale, Szeged, Hongrie (Professeur B. KÖRPÁSSY) et de l'Institut d'Anatomie Pathologique de l'Université, Strasbourg, France (Professeur L. FRUHLING)

STRUCTURE FINE DU TISSU VECTEUR DANS LE CŒUR DE RAT

Par

Sz. VIRÁGH et A. PORTE *

Avec 16 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 8 Mai 1961)

La structure fine des fibres musculaires de régions déterminées du tissu vecteur a déjà été précisée par la microscopie électronique (MUIR 1957: fibres de Purkinje chez le mouton; CAESAR, EDWARDS et RUSKA 1958: fibres de Purkinje et faisceau de His chez le mouton; BOMPIANI, ROUILLER et HATT 1959: faisceau de His chez le rat). L'étude du tissu vecteur dans le cœur de rat nous a montré l'existence d'assez nettes variations ultrastructurales dans les différentes parties de ce système. Les fibres ayant les caractères spécifiques les plus accusées se trouvent dans le nœud de Keith-Flack (VIRÁGH et PORTE 1960).

Dans cette étude des différentes parties du tissu vecteur dans le cœur de rat, nous envisagerons essentiellement la structure des fibres vectrices et leurs rapports avec les autres fibres du myocarde. Leurs rapports avec les éléments nerveux seront décrits dans un second article consacré à l'innervation du cœur.

Matériel et méthode

Nous avons utilisé des rats blancs d'âge différent (de la naissance à deux ans). La fragilité du tissu vecteur, en particulier du nœud de Keith-Flack a nécessité l'emploi d'une technique de prélèvement rapide, comprenant un minimum de manipulations. Sur l'animal anesthésié ou assommé, le cœur est libéré avec les gros vaisseaux; les différentes régions du tissu vecteur sont prélevées sur le cœur isolé. La région choisie est immédiatement baignée d'acide osmique (liquide de Palade) avant d'être prélevée et découpée en petits fragments qui sont plongés dans l'acide osmique à 1% tamponné selon Palade. L'opération doit être effectuée en moins d'une minute pour éviter une altération ultrastructurale des fibres spécifiques. Sur un cœur, généralement, le prélèvement d'une seule région est possible. Les pièces sont incluses au méthacrylate de butyle. Les coupes ultrafines sont étudiées au microscope électronique Philips E. M. 100. La coloration, en particulier par l'hématoxyline ferrique — PAS, de coupes semi-fines exécutées sur le même matériel permet un contrôle optique précis.

Résultats

A. Caractères généraux du tissu vecteur

Les fibres vectrices ne diffèrent pas fondamentalement des fibres communes. Le tissu vecteur offre cependant des particularités structurales plus ou moins accusées selon ses différentes parties et que nous pouvons tenter de résumer.

Les myofibrilles, moins nombreuses et plus grêles que dans les fibres communes du myocarde, ont une densité variable, parfois extrêmement faible, en myofilaments. Elles sont disposées à la périphérie de la fibre ou dispersées dans le sarcoplasme; leur orientation souvent très irrégulière et leur trajet ondulé dans les fibres nodales

* Avec la collaboration technique de Mlle. M. E. STOECKEL.

les font apparaître coupées sous diverses incidences. La disposition des myofibrilles dépend de l'arrangement des fibres: très irrégulière dans les fibres enchevêtrées des nœuds, elle devient beaucoup plus régulière dans les fibres parallèles du faisceau de His et dans ses branches.

Le reticulum sarcoplasmique: on retrouve dans les fibres vectrices la disposition habituelle du reticulum sarcoplasmique par rapport aux myofibrilles systèmes longitudinal et transversal, triades (PORTER et PALADE 1957). Le système tubulaire transversale est bien visible et se continue d'une strie Z à l'autre à travers le sarcoplasme. Dans les fibres où les myofibrilles sont peu nombreuses et dispersées, le reticulum existe surtout sous forme d'un système vésiculaire lisse réparti, sans organisation apparente, dans le sarcoplasme.

Le long des membranes plasmatiques, on observe de nombreuses microvésicules. Ces vésicules de pinocytose nous ont paru nombreuses dans les fibres vectrices.

Membranes plasmatiques et disques intercalaires: dans le tissu vecteur, comme dans tous le myocarde, les disques intercalaires représentent des limites cellulaires. L'encroûtement des parois aux lieux d'insertion des myofibrilles est analogue aux „terminal bars“. Les parois latérales des fibres présentent également des aspects d'encroûtement lorsqu'elles sont en contact étroit (Fig. 3). Dans certaines parties du tissu vecteur (surtout dans le nœud de Keith-Flack), les fibres sont tassées et enchevêtrées. Leur surface est irrégulière, digitée. Les contours cellulaires s'intriquent de façon extrêmement complexe, d'où l'allure très sinueuse des limites cellulaires (Fig. 4). Les disques intercalaires restent cependant, dans leur partie interfibrillaire, moins contournés, plus simples que dans les fibres communes.

Le sarcolemme conserve son aspect habituel de basale doublant la membrane plasmatique. Quand les fibres sont en contact très étroit, cette basale disparaît. Les membranes peuvent alors présenter des encroûtements de type desmosome, fréquemment situés au niveau des stries Z auxquelles les relie le système tubulaire transversale. Ces particularités se retrouvent chez la tortue (FAWCETT, SELBY 1958) et le crapaud (GRIMLEY, EDWARDS 1960). Des rapprochements et écartements successifs des membranes plasmatiques dessinent parfois une sorte de système lacunaire entre deux fibres. Enfin, des encoches plus ou moins profondes du sarcolemme en regard des stries Z s'observent dans les fibres vectrices comme dans les fibres communes.

Les mitochondries sont, comme dans les fibres communes, allongées parallèlement à l'axe des myofibrilles. Dans les régions du sarcoplasme où les myofibrilles sont absentes ou orientées de façon très irrégulière, anarchique, les mitochondries sont dispersées et de forme généralement ovoïde. Elles sont, dans les fibres vectrices, moins nombreuses et moins riches en crêtes que dans les fibres communes; elles conservent cependant une densité en crêtes caractéristique des mitochondries cardiaques.

L'appareil de Golgi, dans la région péri-nucléaire, est peu développé. Il n'offre dans les fibres vectrices aucune particularité.

Des structures granulaires de nature variée (ribosomes, glycogène, pigments lipidiques), se retrouvent dans les fibres vectrices comme dans les fibres communes.

Le glycogène apparaît sous forme d'un matériel grossièrement granulaire réparti de façon diffuse dans le sarcoplasme et d'abondance variable selon les

fibres. Il est possible d'établir un rapport entre la quantité de ce matériel granulaire et l'intensité de la coloration au PAS des fibres. Une superposition précise n'est cependant pas toujours possible.

Une variété de grains très dense apparaissant aux lieux d'interruption des myofilaments sur la coupe représente, selon nous, des artéfacts de couteau.

Des structures granuleuses d'aspect et d'origine complexes, surtout fréquentes chez les vieux rats, sont en relation avec la formation de pigments lipidiques (lipofuchsines). Ces pigments lipidiques nous ont paru moins nombreux dans les fibres vectrices que dans les fibres du myocarde.

Des grains assimilables aux grains de Palade ou ribosomes sont dispersées, dans le sarcoplasme ou fixés sur des sacs ergastoplasmiques d'ailleurs peu nombreux dans ces fibres.

B. Les différentes parties du tissu vecteur

Le nœud de Keith-Flack. Le nœud de Keith-Flack dont l'existence a été mise en doute chez le rat (PRAKASH 1954) correspond à une formation bien caractérisée par sa morphologie optique (HALPERN 1955, MUIR 1955) et électronique (VI-RÁGH et PORTE 1960). Le nœud de Keith-Flack forme autour de la veine cave supérieure un fer à cheval dont les extrémités supérieure et inférieure sont composées des fibres les plus minces du myocarde. Sur les préparations optiques, ces fibres nodales sont même difficiles à identifier comme des fibres musculaires sur les coupes transversales (Fig. 1). A la périphérie du nœud, les fibres se transforment progressivement en fibres auriculaires; vers le centre du nœud, le long de l'artère propre, les fibres nodales s'enchevêtrent et s'articulent de façon complexe avec les différents types de fibres auriculaires.

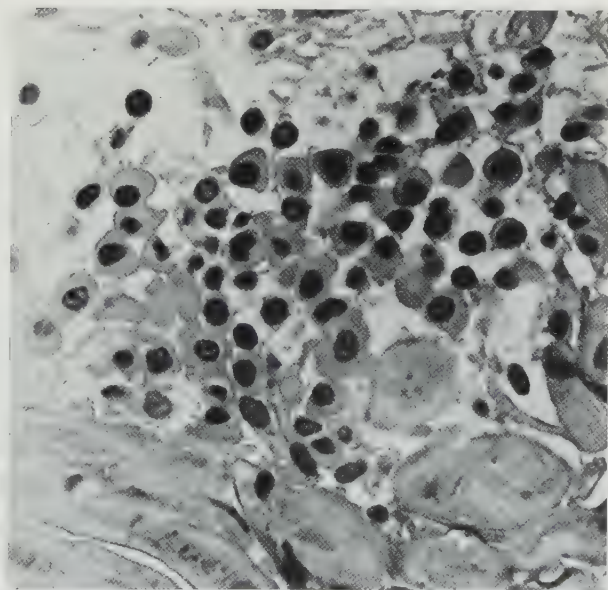


Fig. 1. Fibres minces de la partie supérieure du nœud de Keith-Flack. Hématoxyline ferrique-PAS

Les fibres nodales sont extrêmement pauvres en myofibrilles souvent très grêles et dispersées dans le sarcoplasme. Ces myofibrilles paraissent s'orienter de façon tout à fait anarchique et sont coupées sous une variété d'incidences. Le sarcoplasme clair contient très peu de granulations de glycogène. (Ces myofibrilles se colorent d'ailleurs très faiblement au PAS.) Il existe peu de mitochondries; celles-ci sont plus pauvres en crêtes que les mitochondries des autres fibres vectrices.

A la périphérie du nœud, les fibres se groupent en petits faisceaux de quelques fibres étroitement associées qui se moulent les unes contre les autres (Fig. 2 et 3). La basale sarcolemmique disparaît; les membranes plasmatiques sont en contact intime et présentent des encoûtements de type desmosome. Comme nous l'avons

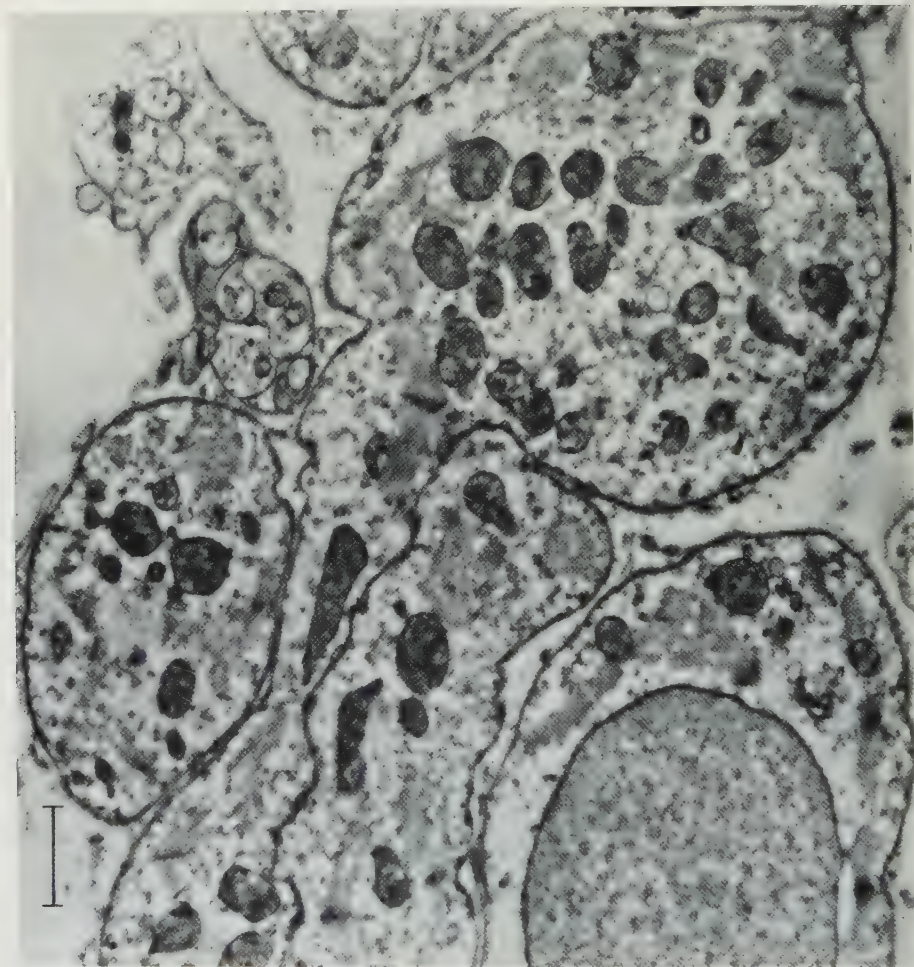


Fig. 2. Nœud de Keith-Flack. Fibres minces, pauvres en myofibrilles. Entre deux fibres étroitement associées, disparition de la basale et apparition d'encoûtements de type desmosome

déjà signalé, ces encoûtements paraissent fréquemment en relation avec les stries Z.

Dans la zone d'insertion des fibres nodales sur le myocarde auriculaire, les fibres présentent sur les préparations optiques une très grande irrégularité de diamètre. Cette région montre une intrication complexe de tous les types de fibres auriculaires (VIRÁGH et PORTE 1960). Les fibres nodales d'une part se transforment en d'autres types de fibres, d'autre part s'insèrent par d'étroites et nombreuses digitations sur les fibres auriculaires (Fig. 6 et 7). Les images d'association entre les digitations musculaires de structure nodale et les fibres auriculaires

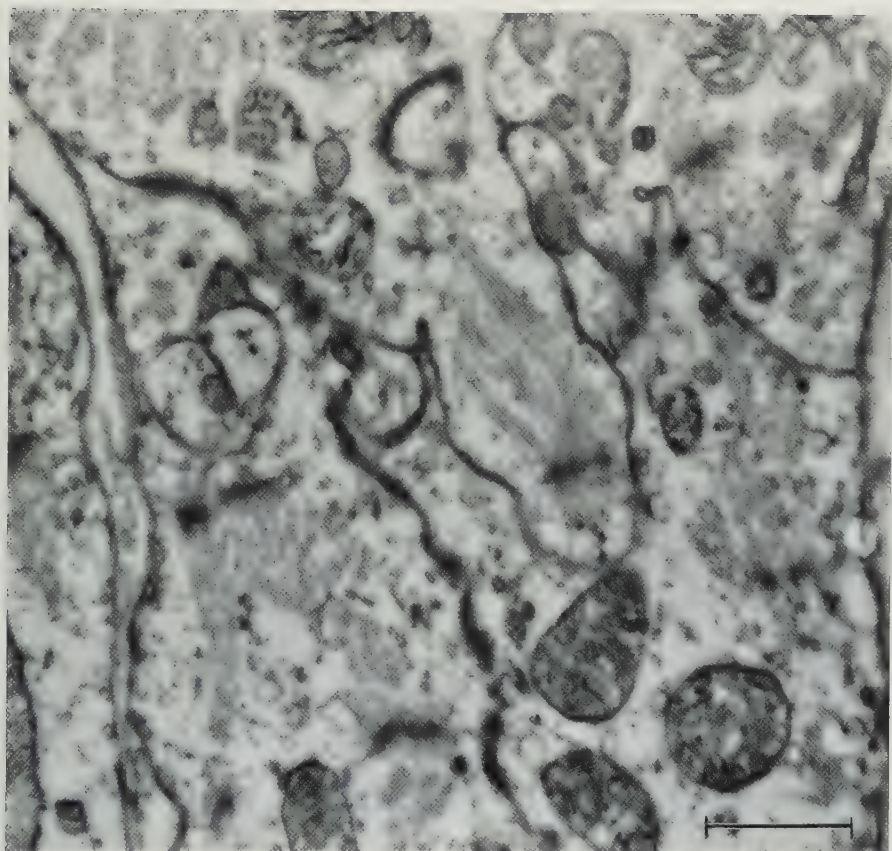


Fig. 3

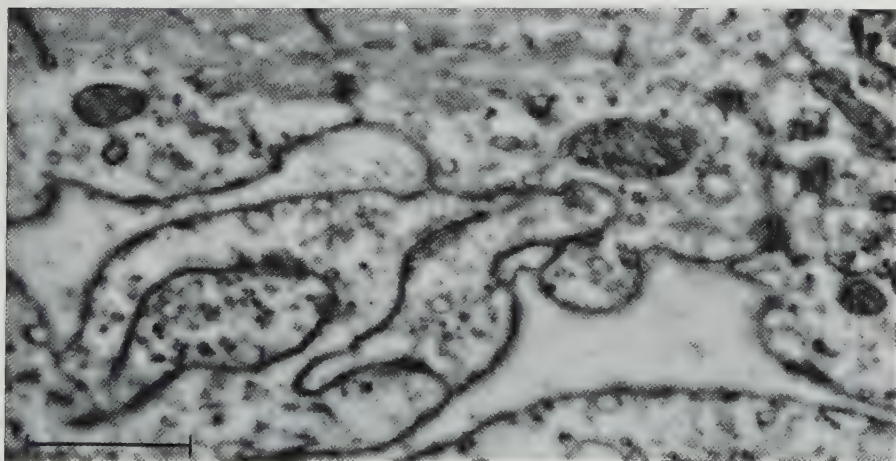


Fig. 3 et 4. Nœud de Keith-Flack. Détails montrant l'enchevêtrement et l'accolement des fibres

communes soulignent nettement les différences ultrastructurales qui existent entre les deux sortes de fibres (Fig. 6 et 7). Ces contacts extrêmement étroits entre

fibres nodales d'une part, et communes d'autre part, sont caractéristiques du nœud de Keith-Flack.

L'hétérogénéité des fibres auriculaires, très nette au voisinages du nœud de Keith-Flack est cause d'une certaine confusion dans les travaux optiques. Un système de fibres de Purkinje a été décrit par TODD (1932), PRAKASH (1954).

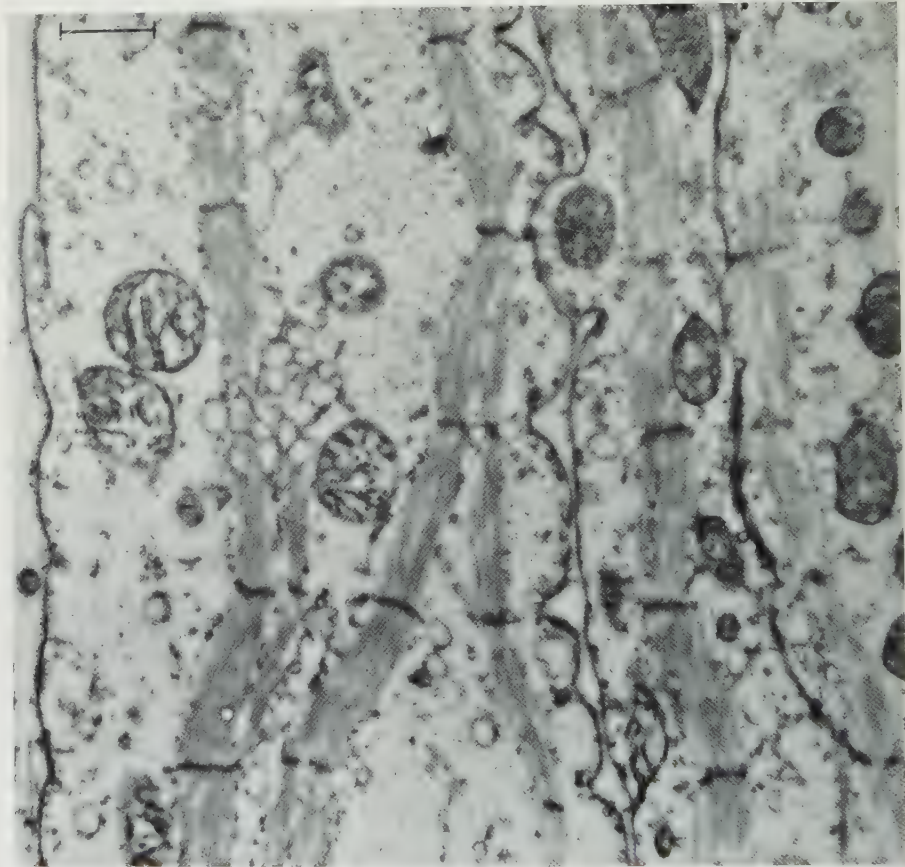


Fig. 5. Nœud de Keith-Flack: zone intermédiaire entre le nœud et les fibres auriculaires. Myofibrilles grêles dont l'orientation devient plus régulière. Reticulum sarcoplasmique organisé par rapport aux myofibrilles

D'autres auteurs n'ont confirmé l'existence de telles fibres qu'au voisinage des deux nœuds (COPENHAVER et TRUEX 1952) ou du seul nœud de Keith-Flack (MUIR 1955). Des fibres de type nodal ont été décrites à l'abouchement des gros vaisseaux (LECHNER 1942; COAKLEY et KING 1959). Nous avons dans un article récent (VIRÁGH et PORTE 1960) décrit l'ultrastructure de différents types de fibres auriculaires ainsi que leur localisation. Nous pouvons résumer brièvement ces données:

Les fibres auriculaires communes diffèrent peu des fibres ventriculaires.

Des fibres, dont la structure rappelle celle des fibres nodales du nœud de Keith-Flack, se rencontrent dans les muscles pectinés, les couches sous-endo-

cardique et sous-epicardique. Ce type de fibre a été décrit sous la dénomination de „fibre claire“ (BOMPIANI, ROUILLER et HATT 1959). Ces fibres sont relativement pauvres en myofibrilles, mais ne peuvent être comparées sur ce point aux fibres les plus caractéristiques du nœud de Keith-Flack. Elles sont de plus régulièrement orientées et ne montrent pas d'intrications caractéristiques des fibres nodales.

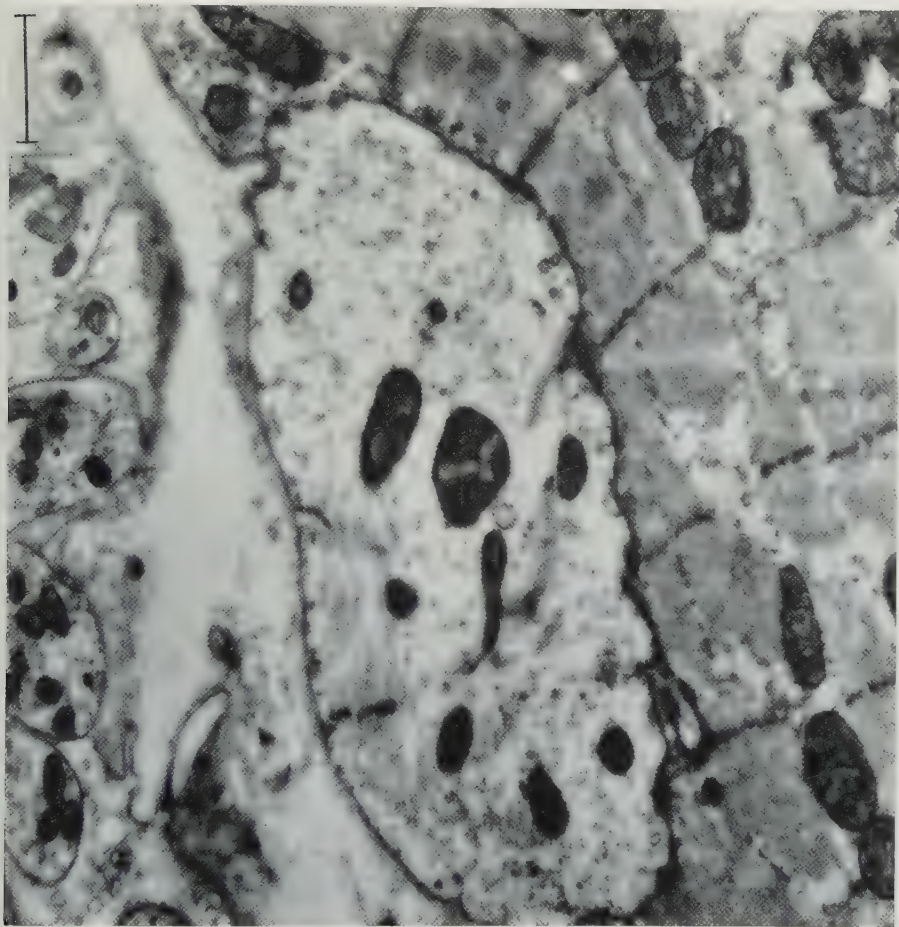


Fig. 6

Fig. 6 et 7. Contacts par digitations entre fibres nodales et fibres auriculaires communes. Le contraste est frappant entre les fibres de structure banale et les digitations nodales claires, paraissant parfois dépourvues de myofibrilles

Des fibres analogues aux fibres de Purkinje ventriculaires existent dans les oreillettes et au voisinage des nœuds de Keith-Flack et de Tawara (Fig. 12 et 13).

Tous les types de fibres auriculaires (fibres communes, fibres de type Purkinje, fibres minces d'aspect nodal) se rencontrent au niveau du nœud de Keith-Flack. Une classification rigoureuse de ces fibres est impossible: tous les aspects intermédiaires peuvent être réalisés lors des transformations progressives des différentes fibres.

Nœud de Tawara et faisceau de His. Il n'existe à la périphérie du nœud de Tawara aucune limite nette entre les fibres auriculaires et nodales. Les fibres

auriculaires communes se transforment progressivement en fibres nodales. Il n'existe pas de connections entre les fibres nodales et un type particulier de fibre auriculaire. Les fibres de type Purkinje qui se trouvent dans l'anneau fibreux n'ont aucun rapport avec les fibres nodales.

Les fibres périphériques du nœud de Tawara sont dispersées dans le tissu conjonctif (Fig. 8). Elles se groupent et s'enchevêtrent de façon de plus en plus compacte (le nœud prenant une forme de cône) en se rapprochant du faisceau de

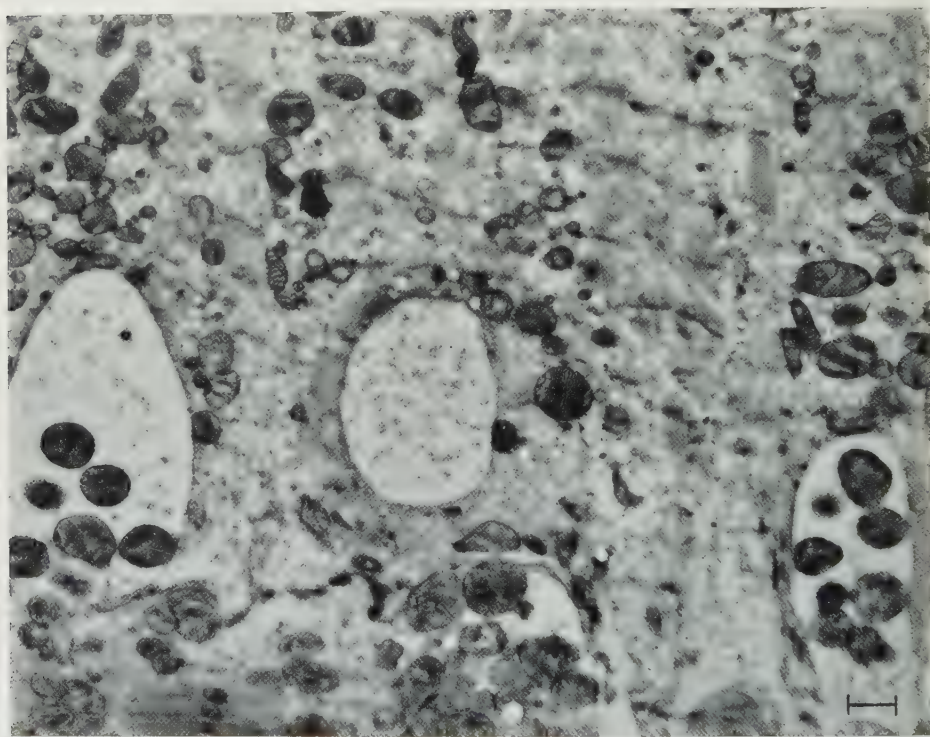


Fig. 7

His. Les fibres nerveuses rassemblées en gros faisceaux à la périphérie pénètrent par petits faisceaux de plus en plus abondants dans la profondeur du nœud et forment de véritables manchons autour des fibres musculaires.

On ne retrouve pas dans le nœud de Tawara les faisceaux de fibres étroitement associées caractéristiques du nœud de Keith-Flack. Les fibres sont enchevêtrées de façon plus lâche (Fig. 9). Les contacts par digitations latérales existent mais sont moins fréquents. Des interdigitations complexes se retrouvent dans les zones d'intersection de plusieurs fibres (Fig. 11). Les intrications neuromusculaires sont caractéristiques du nœud de Tawara.

Les fibres du nœud de Tawara se distinguent de celles du nœud de Keith-Flack par un plus grand diamètre et une plus grande richesse en myofibrilles. Les myofibrilles sont également plus volumineuses; myofilaments y sont groupés des façon plus dense; leur orientation, quoique irrégulière, est moins anarchique.

Les myofibrilles dispersées dans le sarcoplasme sont nettement orientées dans l'axe de la fibre; elles ont souvent un trajet ondulé et spiralé (Fig. 9 et 10). Le sarcoplasme contient de nombreux granules de glycogène: cette constatation est en accord avec la coloration franche des fibres au PAS. Les mitochondries sont un peu plus riches en crêtes que dans les fibres du nœud de Keith-Flack.

Dans le *faisceau de His*, les fibres deviennent parallèles. Les myofibrilles prennent une orientation régulière à la périphérie de la fibre. Les fibres étroitement

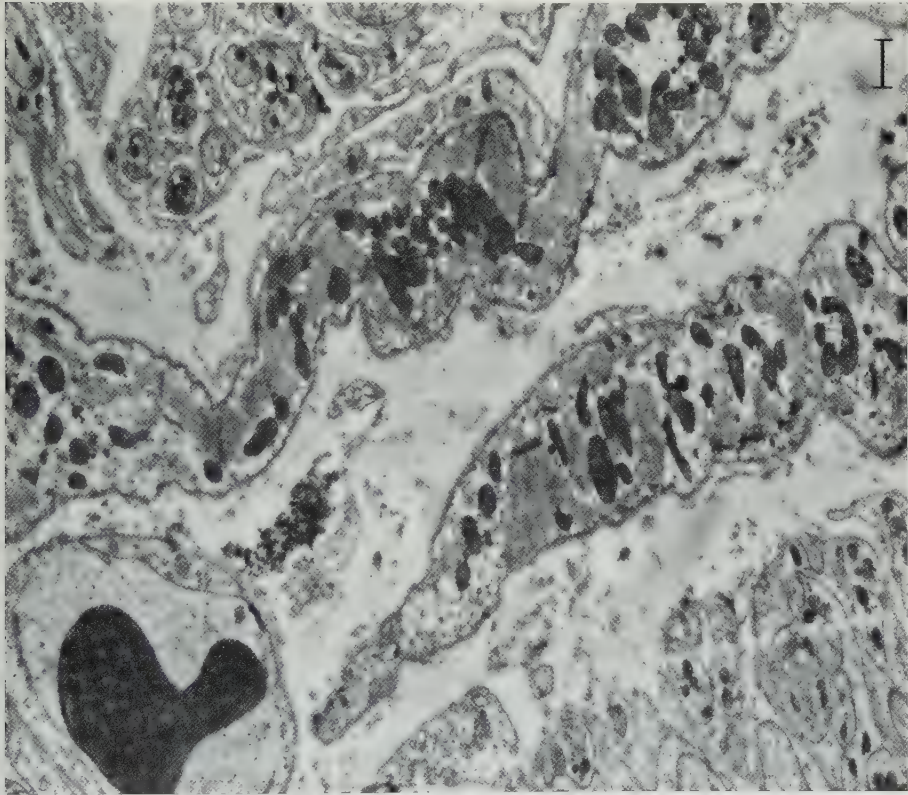


Fig. 8. Nœud de Tawara: Fibres périphériques. Fibres sinueuses dispersées, plus riches en myofibrilles que dans le nœud de Keith-Flack. Eléments nerveux

associées s'enrichissent progressivement en myofibrilles. Le contact intime entre les parois amène la disparition de la basale sarcolemmique (Fig. 14).

Après avoir traversé l'anneau fibreux, le faisceau de His est entouré jusqu'à la bifurcation d'une gaine conjonctive, nerveuse et musculaire. Les fibres musculaires de cette gaine suivent un trajet plus ou moins spiralé autour du faisceau. Elles sont morphologiquement identiques aux fibres situées à l'intérieur du faisceau de His.

Bifurcation et branches du faisceau de His. Au niveau de la bifurcation, les fibres perdent de nouveau leur orientation régulière et s'enchevêtrent comme dans le nœud de Tawara. Cependant, les fibres diffèrent nettement de celles du nœud

de Tawara : leur richesse en myofibrilles réparties de façon homogène les rapproche plus des fibres myocardiques communes que des fibres nodales.

Dans la branche gauche, les fibres ne sont pas groupées de façon aussi dense que dans la branche droite. Elles tendent d'emblée à s'étaler et s'épanouissent

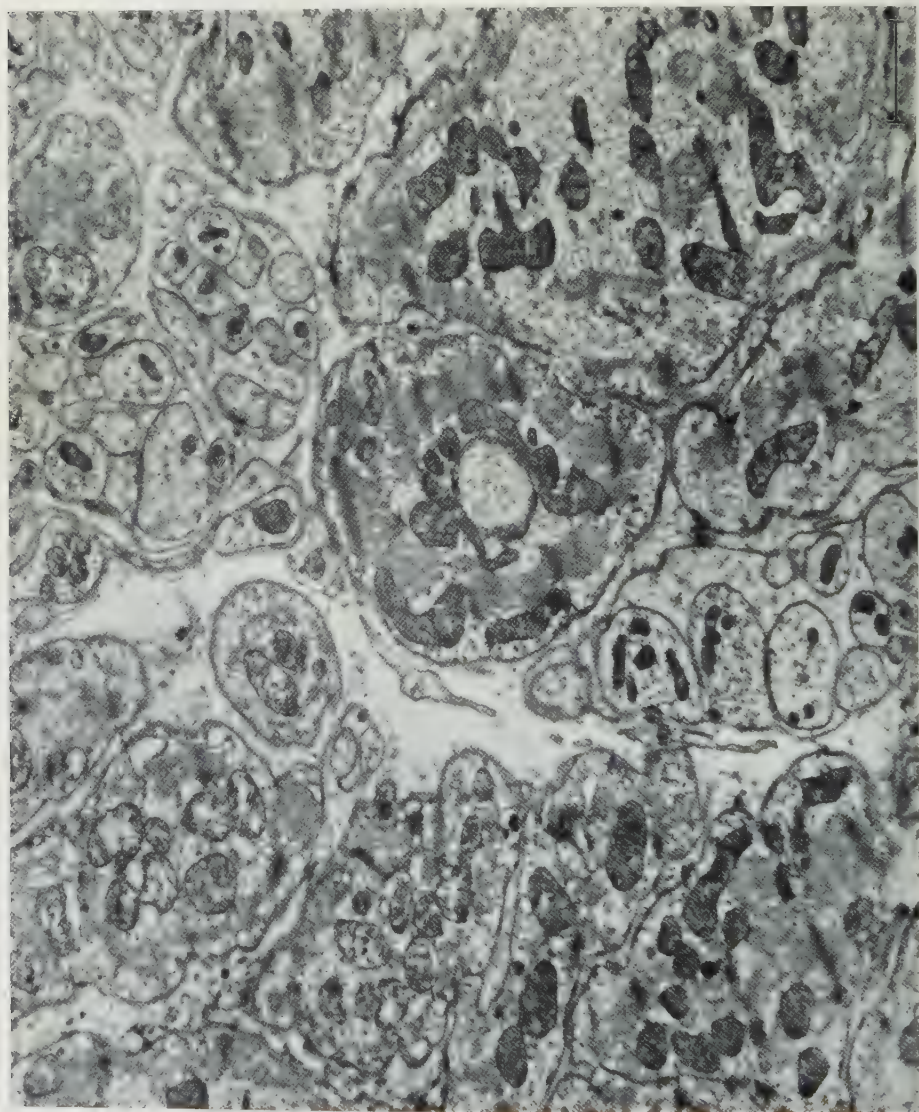


Fig. 9. Nœud de Tawara : Partie centrale. Enchevêtrement de fibres musculaires et nerveuses

en éventail sur la cloison interventriculaire. Dans la partie supérieure de la branche, jusqu'aux faux tendons, leur ultrastructure est analogue à celle des fibres de la bifurcation ; ensuite, elles se transforment en fibres de Purkinje.

Les fibres de la branche droit forment un faisceau compact accompagné par des vaisseaux et des nerfs jusqu'au muscle pilier antérieur où elles se résolvent en fibres de Purkinje (Fig. 15).

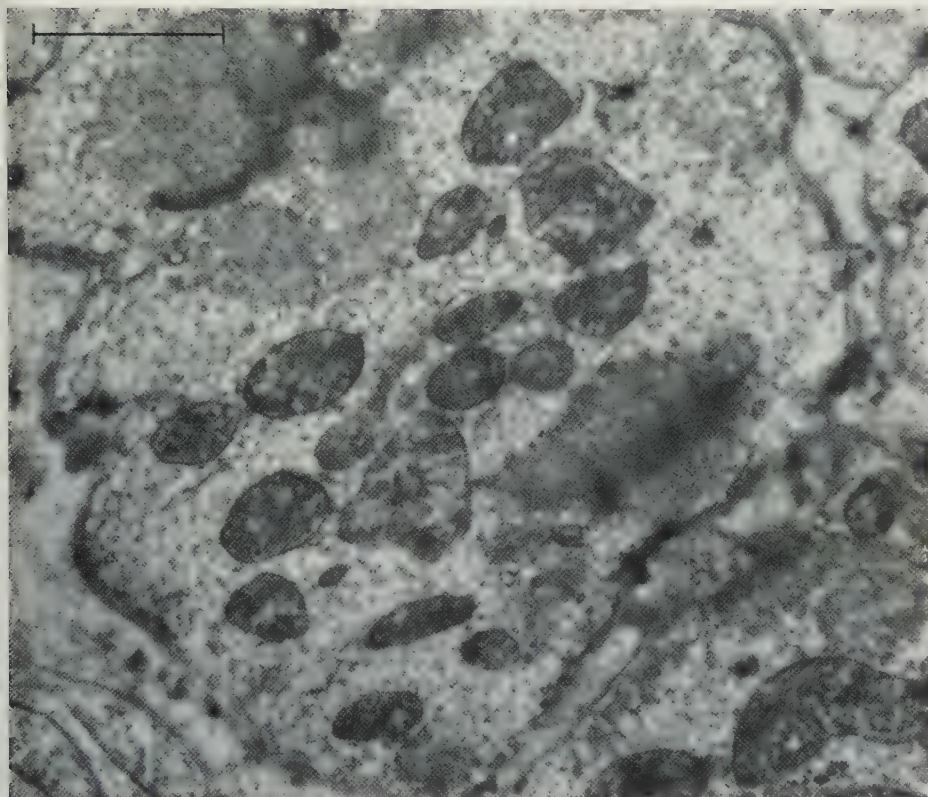


Fig. 10. Fibre du nœud de Tawara. Trajet ondulé des myofibrilles. Richesse en granulations de glycogène

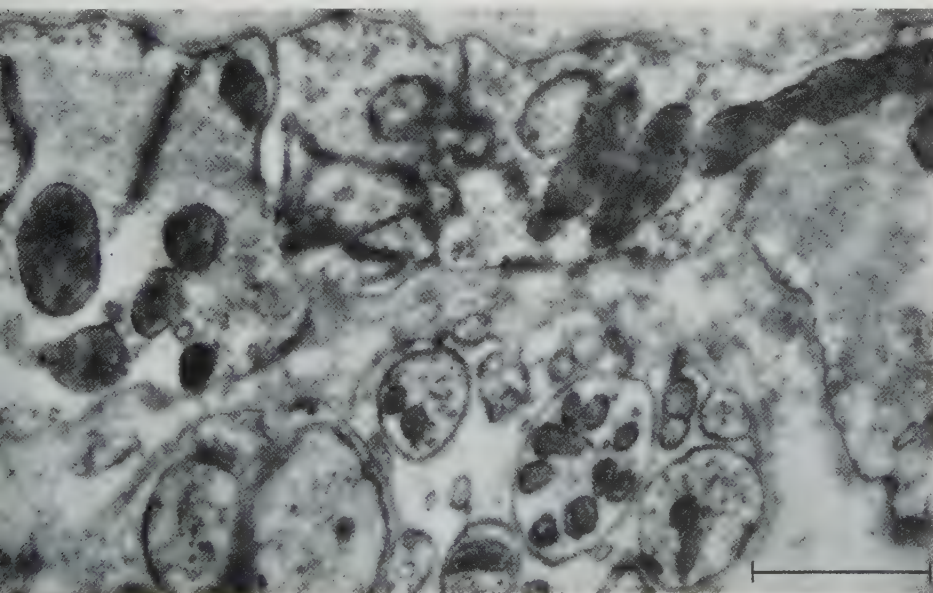
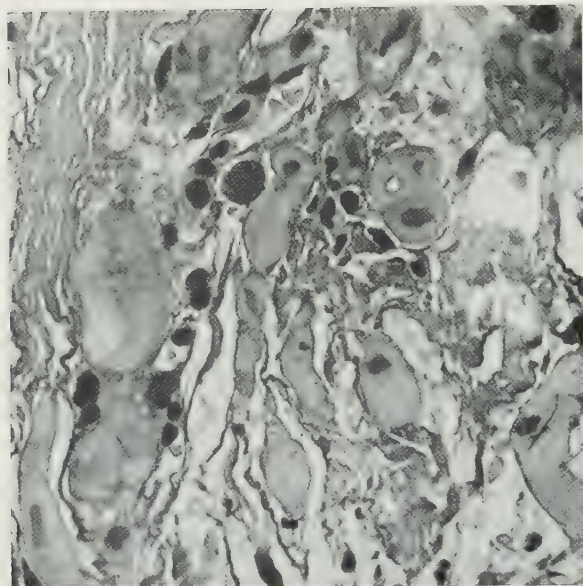


Fig. 11. Nœud de Tawara: Sinuosité des limites cellulaires dans une zone d'intrication entre plusieurs fibres. Proximité d'éléments nerveux



Dans la partie supérieure de la branche gauche, jusqu'aux faux tendons, et dans la branche droite jusqu'au muscle pilier, les fibres colorent au PAS aussi fortement que dans le faisceau de His. Elles diffèrent cependant, par leurs caractères ultrastructuraux, des autres fibres vectrices et, en dehors d'un sarcoplasme péri-nucléaire plus abondant et d'une plus grande richesse en granules de

Fig. 12. Anneau fibreux. Fibres de diamètre inégale dispersées dans le tissu conjonctif. Fibres de type Purkinje auriculaires (à gauche)

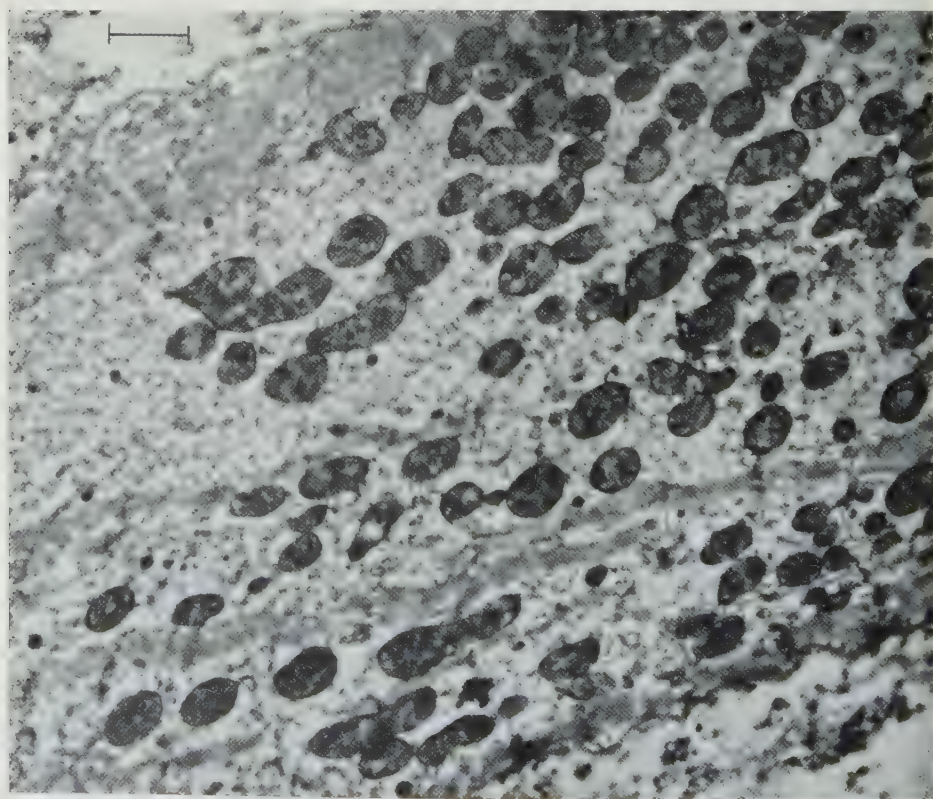


Fig. 13. Fibre de type Purkinje (périphérie du nœud de Keith-Flack). Structure fine et diamètre équivalent aux fibres de Purkinje ventriculaires

glycogène, ne se différencient guère des fibres communes du myocarde, en particulier des fibres auriculaires.

Les fibres de Purkinje. Chez le rat, les fibres de Purkinje sont également plus larges que les autres fibres cardiaques. Cependant, cette différence de diamètre est moins accusée que chez le mouton. Ces fibres sont disposées plus régulièrement

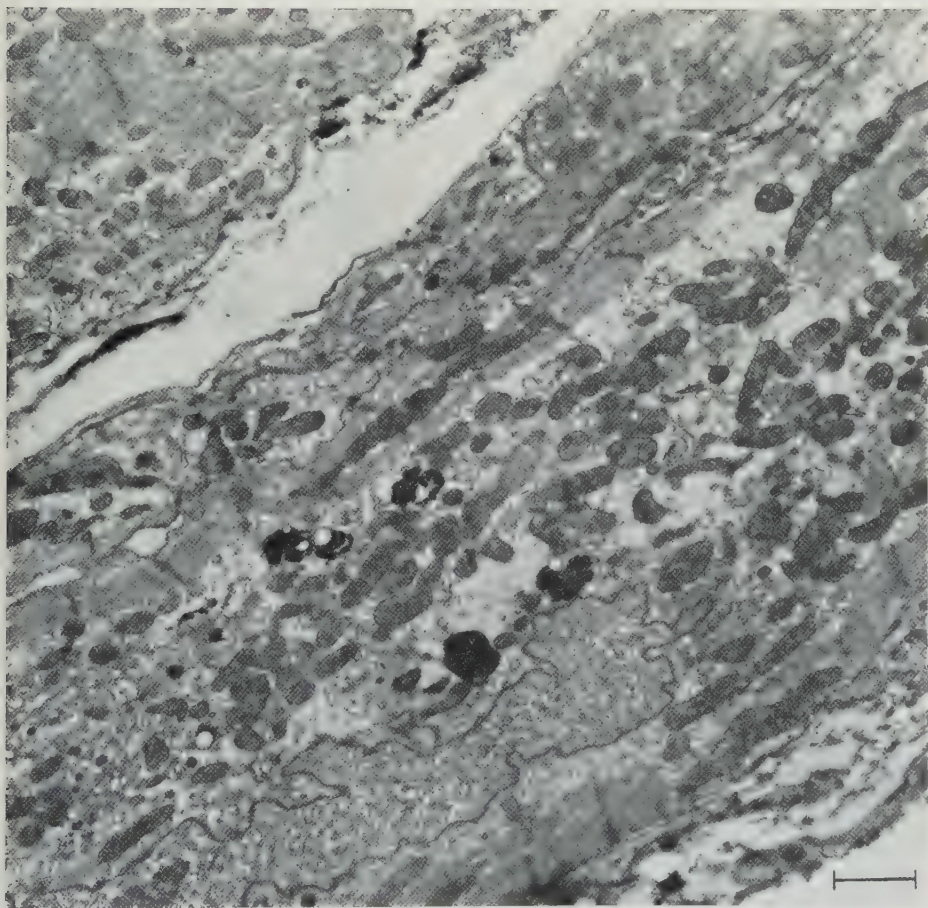


Fig. 14. Faisceau de His: Disposition plus régulière des fibres qui sont étroitement associées. Remarquer la présence de lipopigments (près du noyau)

que dans le nœud de Tawara ou le faisceau de His. Les myofibrilles sont périphériques; le sarcoplasme est riche en granulations de glycogène. Les myofibrilles sont plus grêles et moins nombreuses que dans les branches du faisceau de His (Fig. 16).

Discussion

La connaissance des propriétés ioniques et métaboliques des fibres vectrices a beaucoup progressé au cours des dernières années (CORABŒUF 1960, SCHUTZ 1958), mais les résultats acquis n'expliquent qu'imparfaitement les particularités électrophysiologiques du tissu vecteur. Ces dernières ne paraissent pas liées à des

structures spécifiques. Il nous a semblé possible, cependant, d'établir quelques corrélations entre la morphologie fine du système vecteur et ses propriétés physiologiques.

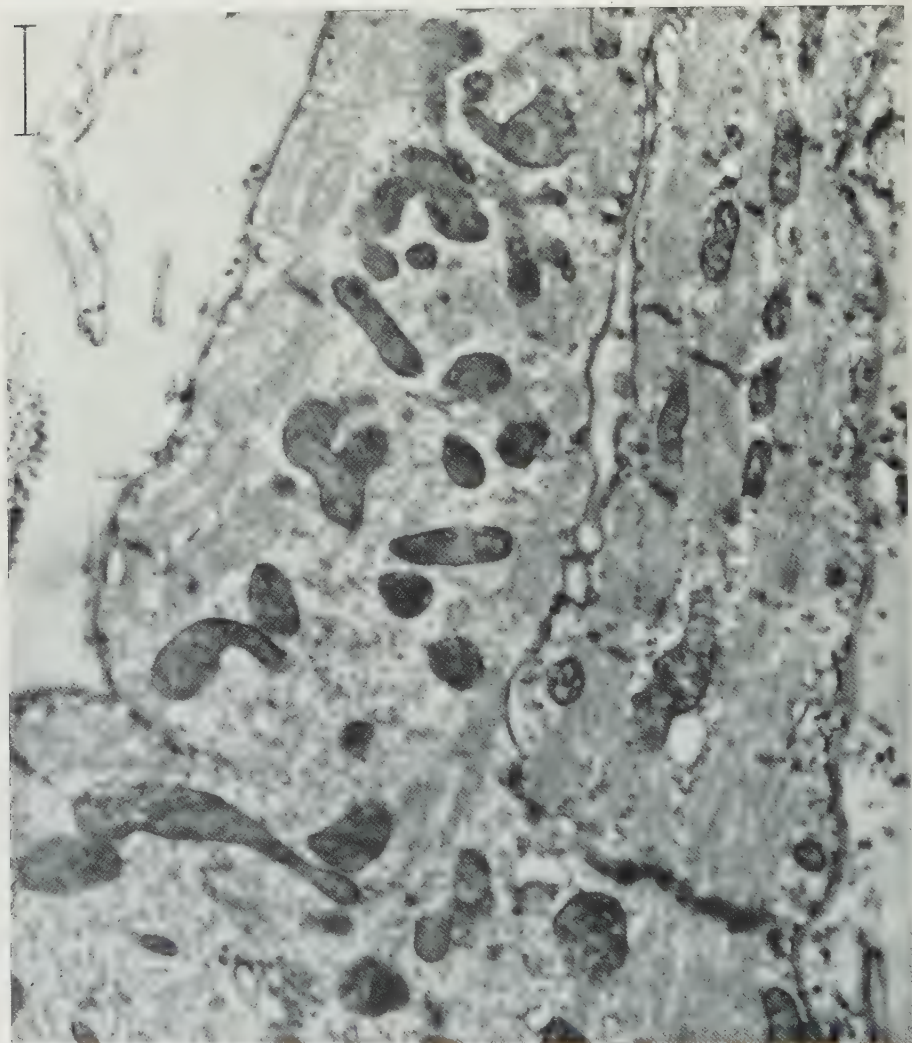


Fig. 15. Transformation de deux fibres de la branche droite du faisceau de His en une fibre de Purkinje

A. Rapports entre la morphologie des fibres et leur fonction

1. L'enchevêtrement des fibres (surtout marquée dans les nœuds), l'existence entre elles de grandes surfaces de contact dues aux nombreuses interdigitations des membranes plasmiques très rapprochées peuvent faciliter la diffusion de l'excitation dans les faisceaux de fibres par conduction longitudinale et transversale. Les encroûtements latéraux, de type desmosome, pourraient avoir une fonction semblable à celle des disques intercalaires qui, d'après BOURNE (1953), loin de constituer une barrière, favoriseraient la conduction. D'autre part, s'il

existe un passage direct de l'excitation entre strie Z et membrane plasmique (HUXLEY et TAYLOR 1955), les desmosomes latéraux, situés préférentiellement au niveau des stries Z et reliées à celles-ci par l'appareil tubulaire transversale, pourraient établir ou faciliter, à un niveau donné, une liaison fonctionnelle entre le système des membranes Z de deux fibres.

2. Les vésicules de pinocytose, nombreuses dans les fibres vectrices, peuvent correspondre à des échanges ioniques importants. Elles paraissent plus abondantes

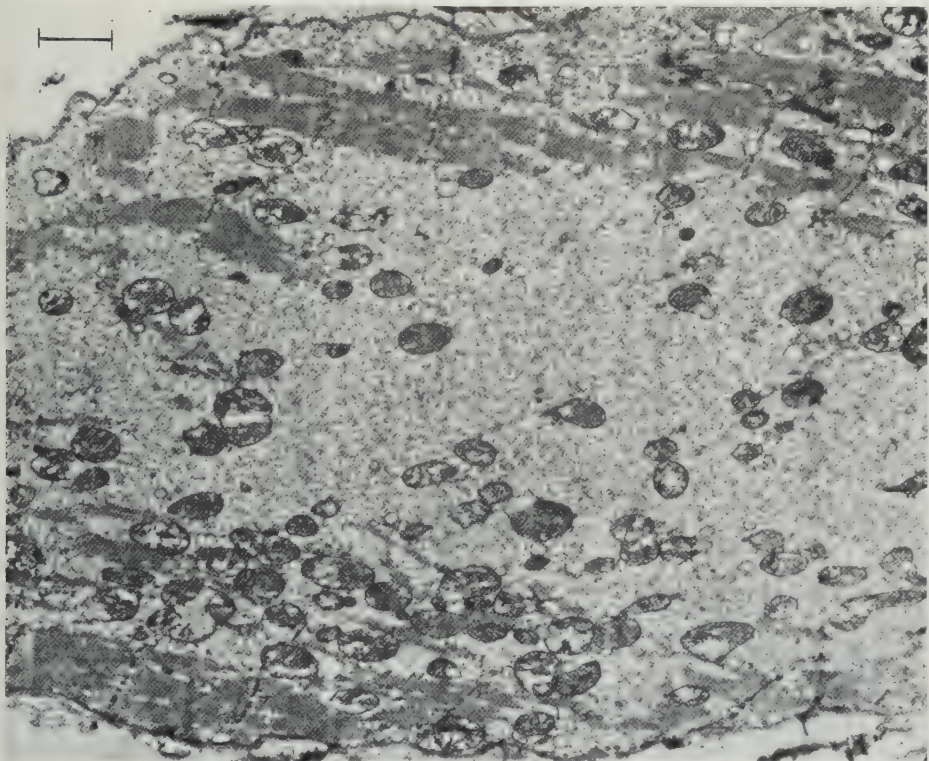


Fig. 16. Fibre de Purkinje des branches du faisceau de His

dans les fibres du nœud de Keith-Flack. Une relation entre ces vésicules et l'instabilité ionique en rapport avec le potentiel pace-maker (HUTTER et TRAUTWEIN 1956) du nœud de Keith-Flack peut être envisagée.

3. Le reticulum sarcoplasmique, dans les fibres vectrices pauvres en myofibrilles, apparaît surtout sous forme vésiculaire diffuse; sa forme organisée prédomine au contraire dans les fibres communes. L'enrichissement progressif des fibres en myofibrilles le long du tissu vecteur s'accompagne d'une modification également progressive du reticulum sarcoplasmique (Fig. 5). Il a été attribué à ce système un rôle dans la propagation des influx dans la fibre musculaire (PORTER et PALADE 1957; EDWARDS et coll. 1956; RUSKA 1958; PEACHEY et PORTER 1959). La fonction de ce système inaccessible aux investigations électrophysiologiques est en fait trop mal connue pour que nous puissions donner une interprétation dynamique de ses divers aspects dans le tissu vecteur.

B. Relations entre la structure et la physiologie des différentes parties du tissu vecteur

I. Le nœud de Keith-Flack. Dans la partie supérieure du nœud, point de départ de l'excitation cardiaque (LEWIS et coll. 1910) se trouvent les fibres les plus caractéristiques du tissu vecteur. Ces fibres, qui sont les plus minces et les plus pauvres en myofibrilles de tout le myocarde, sont, nous l'avons dit, étroitement adaptées les unes aux autres; leurs contours sont extrêmement digités et intriqués; les membranes plasmiques très rapprochées sont dépourvues de basale sarcolemmique et présentent de nombreux encroûtements de type desmosome. Le nœud de Keith-Flack correspond donc à une formation aussi bien caractérisée morphologiquement que physiologiquement; les caractéristiques structurales du tissu vecteur y sont également les plus fortement marquées, parfois même de façon caricaturale.

Au point de contact entre le nœud et le myocarde auriculaire, l'intrication entre fibres nodales et auriculaires est extrême. On retrouve ici tous les types de fibres auriculaires. Cette hétérogénéité des fibres peut expliquer certaines propriétés électrophysiologiques du nœud de Keith-Flack:

Dans le nœud de Keith-Flack existent différents tracés électromyographiques (HUTTER et TRAUTWEIN 1956) qui peuvent être rapportés à ces diverses sortes de fibres.

La diffusion de l'excitation dans l'oreillette à des vitesses variables autour du nœud de Keith-Flack (PUECH et coll. 1954) peut s'expliquer par l'enchevêtrement des fibres nodales avec les différentes fibres auriculaires. La vitesse de propagation est plus grande entre les auricules (fibres de type Purkinje) et dans la région sousépicaudique (fibres claires évoquant les fibres nodales). Ces variations électrophysiologiques correspondent à une différenciation structurale des fibres auriculaires.

La propagation de l'impulsion à partir du tissu vecteur dans l'oreillette semble se faire par la voie de deux sortes de connections anatomiques entre fibres nodales et myocarde auriculaire:

1. Transformation progressive de fibres nodales en fibres auriculaires.
2. Pénétration des fibres nodales parmi les fibres auriculaires avec lesquelles elles entrent en contact par de nombreuses digitations latérales.

II. Problème de la conduction entre le nœud de Keith-Flack et le nœud de Tawara. L'existence d'un système de fibres spécifiques assurant la conduction entre les deux nœuds a été admise par divers auteurs (TODD 1932, PRAKASH 1954, CONDORELLI 1929). L'ultrastructure de certaines fibres auriculaires les rapproche effectivement des fibres vectrices. Un certain nombre d'arguments nous font écarter cependant l'hypothèse d'un rôle particulier de ces fibres dans la conduction internodale.

1. Ces fibres pauvres en myofibrilles se trouvent dans des régions où leur rôle moteur est forcément limité: auricules (muscles pectinés), couche sous-épicaudique... On les voit se transformer fréquemment en fibres communes; elles ne forment pas un système cohérent pouvant relier les deux nœuds.

2. L'insertion des fibres auriculaires sur le nœud de Tawara se fait par transformation graduelle de fibres auriculaire communes en fibres nodales à la périphérie du nœud. Le nœud de Tawara ne montre pas, chez le rat, d'autres connections

qu'avec les fibres auriculaires communes. Les fibres de type Purkinje dispersées dans le tissu conjonctif de l'anneau fibreux n'ont aucun rapport avec le nœud de Tawara.

3. Autour des foyers d'infarctus organisés, des fibres myocardiques peuvent s'enrichir en glycogène et prendre l'aspect optique de fibres de Purkinje (VIRÁGH et KISS 1958). Ce type de fibre n'a donc pas forcément dans l'oreillette une signification vectrice.

4. Les observations de CONDORELLI en faveur de voies de conduction préférentielles (chez le chien) entre les deux nœuds n'ont pas été retrouvées par d'autres auteurs (PUECH et coll. 1954: chez le chien; PAES DE CARVALHO et coll. 1959: chez le lapin).

L'existence d'un système de fibres de type particulier reliant les deux nœuds paraît improbable. La connection anatomique et physiologique entre les nœuds de Keith-Flack et de Tawara semble assurée par le tissu auriculaire commun.

III. Connexions auriculo-ventriculaires. Les fibres du faisceau de His s'enrichissent en myofibrilles et diffèrent progressivement des fibres nodales. Entre le nœud de Tawara et le faisceau de His existe une zone à transmission retardée ou «région critique» des physiologists (ALANIS et coll. 1959; HOFFMANN et coll. 1959; HOFFMANN et coll. 1959). Le retard de l'excitation peut être relié à la différenciation structurale des fibres; cependant, un autre facteur doit être considéré: les fibres du nœud de Tawara sont, dans cette région, très richement innervées et la différence très nette, dans les rapports musculo-nerveux, entre les deux parties du tissu vecteur suggère l'intervention d'un processus neurogène dans ce phénomène de transmission retardée.

IV. Le faisceau de His. Les fibres du faisceau de His se rapprochent morphologiquement des fibres communes mais les rapports entre les fibres restent caractéristiques du tissu vecteur (Fig. 14). L'existence autour du faisceau de His d'une gaine musculo-nerveuse comprenant des fibres musculaires morphologiquement identiques à celles qui sont groupées à l'intérieur du faisceau explique que lorsqu'une nécrose en foyer intéresse le faisceau de His la conduction puisse être assurée par des fibres périphériques à caractère vecteur.

V. Les branches du faisceau de His. Les branches du faisceau de His diffèrent selon les espèces (TRUEX et COPENHAVER 1947). Les fibres y sont toutes de type Purkinje chez les ongulés mais non chez les rongeurs (SCHIEBLER 1955) et chez le chien (observation personnelle non publiée). La partie supérieure des branches ne montre pas au microscope électronique des caractéristiques nettes de tissu vecteur. La vitesse de conduction est cependant plus grande dans les branches que dans les fibres communes ou dans le faisceau de His (HOFFMANN et coll. 1959: étude chez le chien).

La transformation progressive en fibres de Purkinje commence plus haut dans la branche gauche que dans la branche droite. La vitesse de conduction est pourtant similaire dans les deux branches (HOFFMANN et coll. 1959). Un facteur autre que la structure des fibres influe donc sur la vitesse de conduction. La conduction dans un muscle ne peut être considérée comme un phénomène électrique simple, comme la „théorie du câble“ (WEIDMANN 1952; DAVIES et FRANCIS 1952). La branche droite étant la plus riche en éléments nerveux, un processus neurogène peut être envisagé.

VI. Les fibres de Purkinje. Les fibres de Purkinje ont une structure caractéristique chez le rat comme chez le mouton. Nous n'avons pas retrouvé les aspects de myofibrilles sans stries décrits par MUIR (1957).

Conclusion

Le système vecteur montre une différenciation morphologique plus ou moins accusée selon ses diverses parties. Les modifications musculaires sont les plus marquées dans le nœud de Keith-Flack. Les fibres vectrices se rapprochent ensuite progressivement des fibres communes. Le nœud de Tawara est caractérisé par une intrication d'éléments musculaires et nerveux.

Il existe dans le myocarde auriculaire plusieurs types de fibres; mais la connexion entre les nœuds de Keith-Flack et de Tawara ne semble pas assurée par un système de fibres spécifiques.

Un certain nombre de données physiologiques semblent pouvoir être reliées à des particularités structurales du tissu vecteur.

Bibliographie

- ALANIS, J., E. LOPEZ, J. J. MANDOKI and G. PILAR: Propagation of impulses through the atrioventricular node. *Amer. J. Physiol.* **197**, 1171—1174 (1959).
- BOMPIANI, G. D., CH. ROUILLER et P. Y. HATT: Le tissu de conduction du cœur chez le rat. Etude au microscope électronique. I. Le tronc commun du faisceau de His et les cellules claires de l'oreillette droite. *Arch. Mal. Cœur* **52**, 1257—1274 (1959).
- BOURNE, G. H.: Enzymes of the intercalated discs of the heart muscle fibres. *Nature (Lond.)* **172**, 588—589 (1953).
- CAESAR, R., G. A. EDWARDS and H. RUSKA: Electron microscopy of the impulse conducting system of the sheep heart. *Z. Zellforsch.* **48**, 698—719 (1958).
- COAKLEY, J. B., and T. KING: Cardiac muscle relation of the coronary sinus, the oblique vein of the left atrium and the left precaval vein in mammals. *J. Anat. (Lond.)* **93**, 30—35 (1959).
- CONDORELLI, L.: Experimentelle Untersuchungen über die interauriculare Reizleitung. *Z. ges. exp. Med.* **68**, 516—528 (1929). Cité par BOMPIANI et coll.
- COPENHAVER, W. M., and R. C. TRUEX: Histology of the atrial portion of the cardiac conduction system in man and other mammals. *Anat. Rec.* **114**, 601—614 (1952).
- CORABOEUF, E.: Aspects cellulaires de l'électrogénèse cardiaque chez les vertébrés. *J. Physiol. (Paris)* **52**, 323—417 (1960).
- DAVIES, F., and E. T. B. FRANCIS: The conduction of impulse for cardiac contraction. *J. Anat. (Lond.)* **86**, 302—309 (1952).
- EDWARDS, G. A., H. RUSKA, P. SOUZA SANTOS and A. VALLEJO FREIRE: Comparative cytophysiology of striated muscle with special reference to the role of the endoplasmic reticulum. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 143—155 (1956).
- FAWCETT, D. W., and C. C. SELBY: Observations on the fine structure of the turtle atrium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 65—71 (1958).
- GRIMLEY, PH., M., and G. A. EDWARDS: The ultrastructure of cardiac desmosome in the toad and their relationship to the intercalated disc. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 305—318 (1960).
- HALPERN, M. H.: The sino-atrial node of the rat heart. *Anat. Rec.* **123**, 425—434 (1955).
- HOFFMANN, B. F., P. F. CRANFIELD, J. H. STUKEY, N. S. AMER, R. CAPPELLETTI and R. T. DOMINGO: Direct measurement of conduction velocity in in situ specialised conducting system of mammalian heart. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **102**, 55—57 (1959).
- HOFFMANN, B. F., A. PAES DE CARVALHO, W. C. MELLO and P. F. CRANFIELD: Electrical activity of single fibers of the atrioventricular node. *Circulat. Res.* **7**, 11—18 (1959).
- HUTTER, O. F., and W. TRAUTWEIN: Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. *J. gen. Physiol.* **39**, 715—733 (1956).

- HUXLEY, A. I., and R. E. TAYLOR: Function of Krause's membrane. *Nature (Lond.)* **176**, 1068 (1955).
- LECHNER, W.: Vorkammermuskulatur und große Herzvenen bei den Säugetieren. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **111**, 545—571 (1942).
- LEWIS, T., A. OPPENHEIMER and B. J. OPPENHEIMER: The site of origine of the mammalian heart beat; the pacemaker in the dog. *Heart* **2**, 147 (1910). Cité par PUECH et coll.
- MUIR, A. R.: The sinu-atrial node of the rat heart. *Quart. J. exp. Physiol.* **40**, 378—386 (1955).
- Observations of the fine structure of the Purkinje fibers in the ventricles of the sheep's heart. *J. Anat. (Lond.)* **91**, 251—258 (1957).
- PAES DE CARVALHO, A., W. C. MELLO and B. F. HOFFMANN: Electrophysiological evidence for specialized fiber types in rabbit atrium. *Amer. J. Physiol.* **196**, 483—488 (1959).
- PEACHEY, L. D., and K. R. PORTER: Intracellular impulse conduction in muscle cells. *Science* **129**, 721—722 (1959).
- PORTER, K. R., and G. E. PALADE: Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 269—299 (1957).
- PUECH, P., M. ESCLAVISSAT, D. SODI-PALLARES and F. CISNEROS: Normal auricular activation in the dog's heart. *Amer. Heart J.* **47**, 174—191 (1954).
- PRAKASH, R.: The heart of the rat with special reference to the conducting system. *Amer. Heart J.* **47**, 241—251 (1954).
- RUSKA, H.: The morphology of muscle fibers and muscle cells with different properties of conduction of excitation. *Exp. Cell Res. Suppl.* **5**, 560—567 (1958).
- SCHIEBLER, TH. H.: Herzstudie. II. Mitt. Histologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen am Atrioventriculärsystem von Huf- und Nagetieren. *Z. Zellforsch.* **43**, 243—306 (1955).
- SCHUTZ, E.: Physiologie des Herzens. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- TODD, T. W.: The specialized systems of the heart. *Cowdry's special cytology* **II**, 1175—1210 (1932).
- TRUEX, R. C., and W. M. COPENHAVER: Histology of the moderator Band in man and other mammals with special reference to the conduction system. *Amer. J. Anat.* **80**, 173—197 (1947).
- VIRÁGH, Sz., et J. KISS: La pathogénèse des lésions du système vecteur au cours de la maladie hypertensive. Congr. d'Anatomie et d'Anatomie Pathologique Hongrois, 1958.
- , et A. PORTE: Ultrastructure du tissu vecteur dans le cœur de rat. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* **154**, 1629—1632 (1960).
- — Le nœud de Keith-Flack et les différents types de fibres auriculaires du cœur de rat. Etude au microscope optique et électronique. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **251**, 2086—2088 (1960).
- WEIDMANN, J.: The electrical constants of Purkinje fibers. *J. Physiol. (Lond.)* **118**, 348—360 (1952).

Sz. VIRÁGH,

Institut d'Anatomie et d'Histologie Pathologique de l'Université Médicale
Szeged (Hongrie), Kossuth Lajos sugárút 40

Travail de l'Institut d'Anatomie et d'Histologie Pathologique de l'Université Médicale, Szeged, Hongrie (Professeur B. KÖRPÁSSY) et de l'Institut d'Anatomie Pathologique de l'Université, Strasbourg, France (Professeur L. FRUHLING)

ELEMENTS NERVEUX INTRACARDIAQUES ET INNERVATION DU MYOCARDE

ÉTUDE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE DANS LE CŒUR DE RAT

Par

Sz. VIRÁGH et A. PORTE *

Avec 15 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 8 Mai 1961)

De nombreux travaux histologiques ont été consacrés à l'innervation du myocarde (cf. DAVIES, FRANCIS et KING 1952; KING et COAKLEY 1958). Mais l'innervation du coeur n'a fait l'objet que de quelques travaux de cytologie fine (COUTEAU et LAURENT 1957; FAWCETT et SELBY 1958) et les rapports musculo-nerveux n'ont pas été étudiés de façon systématique au microscope électronique dans le coeur des mammifères. L'innervation du myocarde diffère selon les régions; une grande variation s'observe à l'intérieur même du tissu vecteur. En précisant les rapports entre fibres musculaires et nerveuses dans le myocarde et en particulier dans le tissu vecteur, la microscopie électronique peut contribuer à résoudre un certain nombre de problèmes concernant la physiologie du coeur.

Matériel et méthode

Nous avons utilisé des rats blancs d'âge variable. Nos techniques de prélèvement et de préparation du matériel biologique ont été décrites dans notre précédente étude du système vecteur (VIRÁGH et PORTE, ce numéro). Les coupes ultrafines ont été étudiées au microscope Philips E. M. 100. Des coupes semi-fines ont été colorées par l'hématoxyline chromique de Gomori ou par l'aldéhyde-fuchsine selon la méthode de Gabe et par l'hématoxyline ferrique — P.A.S. Les mêmes colorations, ainsi que des imprégnations argentiques (technique de BODIAN), ont été pratiquées sur des coupes à la paraffine. Cinq coeurs ont été fixés au liquide de MÜLLER pour la mise en évidence de la réaction chromaffine sur des coupes sériées.

Résultats

A. Les éléments nerveux intra-cardiaques

I. Les ganglions intra-cardiaques. Chez le rat, comme chez presque tous les homéothermes, seules les oreillettes renferment des ganglions nerveux, ces derniers étant plus nombreux dans l'oreillette droite. On les rencontre surtout dans la paroi auriculaire postérieure, le sulcus auriculo-ventriculaire (surtout à droite) et le sulcus terminalis. Il existe quelques variations individuelles: ainsi, chez l'un de nos rats, la cloison inter-auriculaire était exceptionnellement riche en cellules ganglionnaires. Nous n'avons trouvé ni ganglions nerveux ni cellules ganglionnaires isolées dans le tissu vecteur.

Les cellules ganglionnaires ont dans le coeur la même structure élémentaire que dans les autres tissus. Les corps de Nissl présentent leur aspect habituel: agglomération de grains de Palade libres, renfermant un nombre variable de

* Avec la collaboration technique de Mlle. M. E. STOECKEL.

cavités ergastoplasmiques, et distribuées en territoires denses dans le cytoplasme. Ces territoires sont parfois dépourvus de structures membranaires et prennent l'aspect de « corps de Nissl alamellaires » (SMITH 1959). Il peut s'agir d'incidences de coupe n'ayant intéressé que la périphérie d'un corps de Nissl. Des éléments

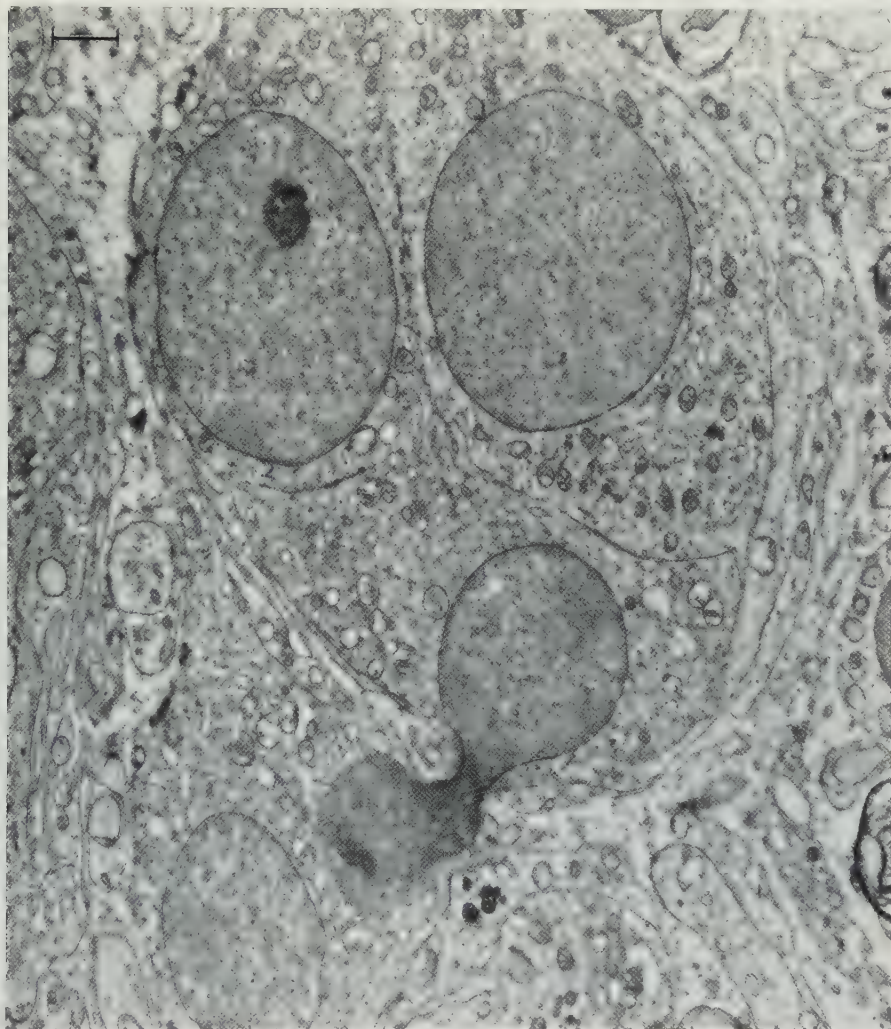


Fig. 1. Groupe de cellules analogues aux éléments chémorécepteurs dans un ganglion nerveux du sulcus terminalis

golgiens caractéristiques sont répartis autour du noyau; les mitochondries sont généralement peu nombreuses et de petite taille. On trouve, disséminés dans le cytoplasme, des enclaves lipidiques et quelques corps denses de nature indéterminée. Ces corps sphériques et de taille variable, voisine de celle des mitochondries, sont formés de membranes enroulées et tassées autour d'une partie centrale homogène et plus ou moins dense. Ils ont été décrits dans d'autres cellules ganglionnaires (PALAY et PALADE 1958; ANDERSON et BREEMEN 1958); on les retrouve aussi dans les cylindraxes.

Les contacts synaptiques présentent l'aspect rencontré habituellement: les cylindraxes renflés, au contact du corps cellulaire, sont riches en fines vésicules et en mitochondries. Nous n'avons trouvé aucune différence ultrastructurale entre les cellules satellites et schwanniennes.

II. Cellules particulières. Dans les ganglions nerveux du sulcus terminalis, nous avons trouvé des cellules différentes des cellules ganglionnaires, groupées

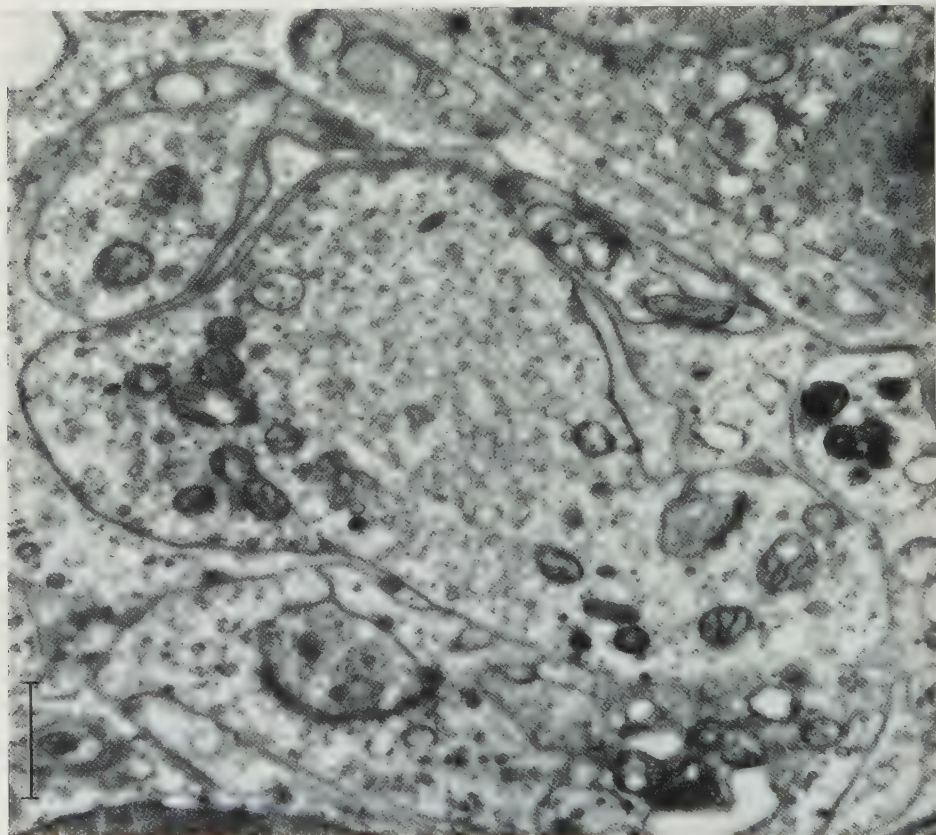


Fig. 2

par petits îlots entourés par les prolongements de cellules satellites (Fig. 1). Leurs rapports avec les neurites paraissent être essentiellement synaptiques: des cylindraxes à structure de boutons terminaux s'accrochent à la périphérie de la cellule dans un repli de la membrane plasmique. Parfois, cependant, un cylindraxe apparaît enfermé et pédiculé dans la cellule comme dans les éléments schwanniens. Ces cellules renferment de nombreuses vésicules à parois lisses; elles sont particulièrement riches en fines vésicules analogues à celles des boutons terminaux. On trouve aussi quelques vacuoles composées. Les grains de Palade libres sont parfois assez nombreux; les sacs ergastoplasmiques sont rares. Les mitochondries sont de petite taille et à matrice claire, comme dans les cellules ganglionnaires. Des corps particuliers se retrouvent dans ces cellules: il s'agit de petites vésicules à cœur dense, d'un diamètre de 60 à 120 m μ , semblables aux granules à cœur dense

décrits dans les éléments chémorécepteurs du corpuscule carotidien (Ross 1959) auxquels nos cellules ressemblent de façon frappantes. Ces corps existent en nombre variable selon les cellules. Ils apparaissent plus nombreux le long de la membrane plasmatique (Fig. 2, 3).

III. Les fibres nerveuses. Les fibres nerveuses, dans le coeur, sont généralement amyéliniques; on trouve cependant quelques fibres myélinisées. Certains cylindr-

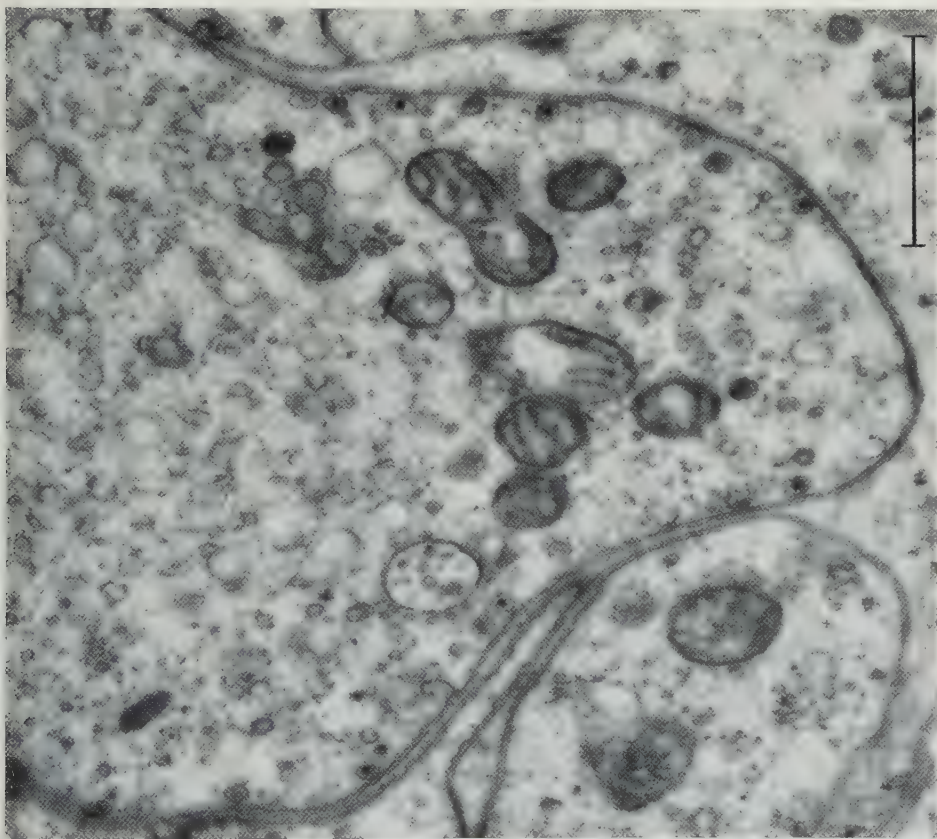


Fig. 3

Fig. 2 et 3. Détails du cytoplasme de ces éléments. Microvésicules à cœur central caractéristiques

axes présentent une richesse en fines vésicules comparable à celle des boutons terminaux (Fig. 4). Cet aspect caractérise surtout les cylindraxes les plus périphériques; ceux qui sont plus profondément enrobés dans la cellule de Schwann conservent leur structure habituelle. Les cylindraxes riches en vésicules paraissent souvent partiellement libérés de l'enrobage schwannien et ne sont séparés du milieu interstitiel que par la basale entourant la cellule de Schwann. Ces images se retrouvent aussi bien dans les faisceaux nerveux des espaces conjonctifs que dans ceux proches du sarcolemme.

On rencontre parfois dans les cylindraxes des structures complexes et mal définies: agglomération de lamelles ou de tubules tendant à s'enrouler comme dans les figures myéliniques et associés à une substance matricielle osmophile

(Fig. 5). Au voisinage de ces formations, quelques mitochondries présentent une désorganisation de leurs cristoe, suggérant une évolution possible de ces éléments vers des structures lamellaires complexes. On rencontre assez fréquemment des corps denses sphériques formés de membranes enroulées de façon compacte autour d'une partie centrale homogène, d'aspect identique à ceux que nous avons décrits dans les cellules ganglionnaires. Nous avons également trouvé quelques formations

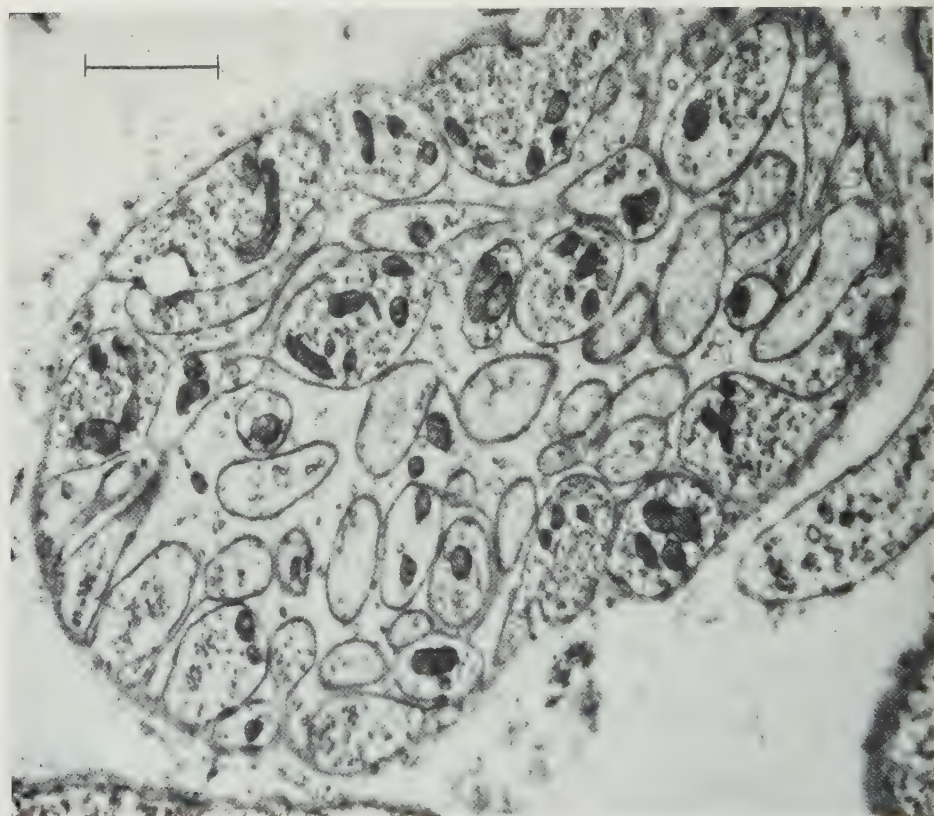


Fig. 4. Faisceau de neurites dans leur gaine de Schwann. Cylindraxes périphériques riches en fines vésicules

rappelant les «corps multi-vésiculaires» décrits dans la médullo-surrénale (DE ROBERTIS 1957) (Fig. 6).

IV. Renflements cylindraxiles. Des formations particulières correspondant à des cylindraxes renflés se rencontrent au voisinage du noeud de Tawara, près de l'abouchement de l'aorte. Le tissu nerveux est particulièrement abondant dans cette région. Parmi les cylindraxes d'aspects normaux, on trouve enrobées dans les mêmes cellules de Schwann, ces formations volumineuses dont l'aspect évoque les corps de Herring (Fig. 7). Ces renflements cylindraxiles renferment des éléments de nature variée: mitochondries, gouttelettes lipidiques, fines vésicules de type synaptiques, corps denses déjà décrits dans les cylindraxes et les cellules ganglionnaires. Ces renflements contiennent en outre de nombreux granules d'un diamètre d'environ 250 à 500 μ , possédant un noyau central d'un

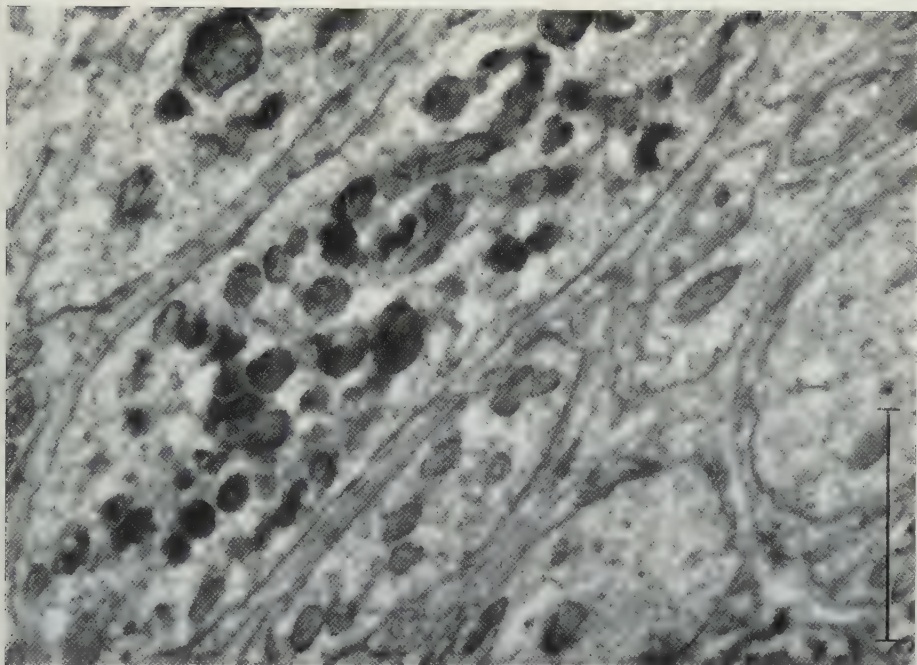


Fig. 5. Formations osmiphiles complexes dans un cylindraxe

diamètre de 200 à 250 μ , comparables par leur structure et leurs dimensions à ceux de la médullo-surrénale (Fig. 8).

Les cylindraxes renflés présentent constamment, semble-t-il, une encoche médiane plus ou moins profonde qui intéresse également l'enveloppe schwannienne. Un petit cylindraxe se trouve emprisonné dans l'étroite gaine cytoplasmique schwannienne séparant le renflement du contenu de l'encoche dans laquelle s'insinue le prolongement d'une autre élément schwannien. Cette disposition retrouvée plusieurs fois ne peut s'expliquer sur nos coupes.

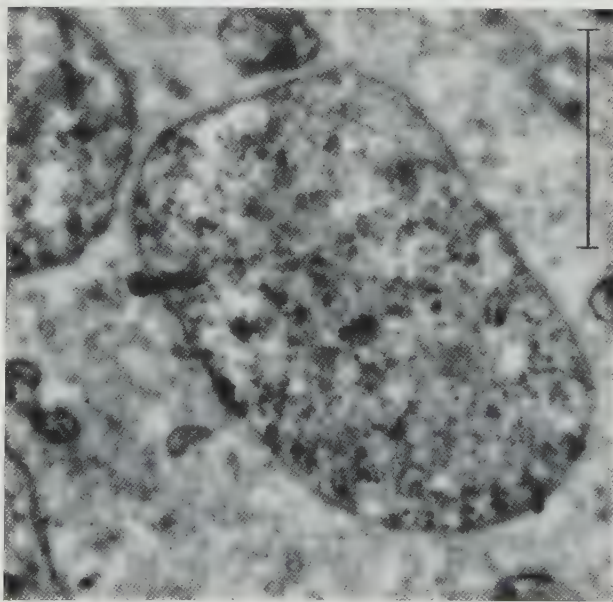


Fig. 6. «Corps multivésiculaire» dans un cylindraxe

B. Innervation du myocarde

Les oreillettes sont beaucoup plus innervées que les ventricules. Les fibres nerveuses sont plus abondantes dans la couche sous-endocardique que dans la

couche sous-épicaudique; elles forment parmi les fibres musculaires un réseau diffus. Dans les ventricules, les petits faisceaux nerveux sont essentiellement en rapport avec les vaisseaux (Fig. 9); le myocarde lui-même est très pauvrement innervé. Dans le tissu vecteur, l'innervation varie beaucoup selon les régions.

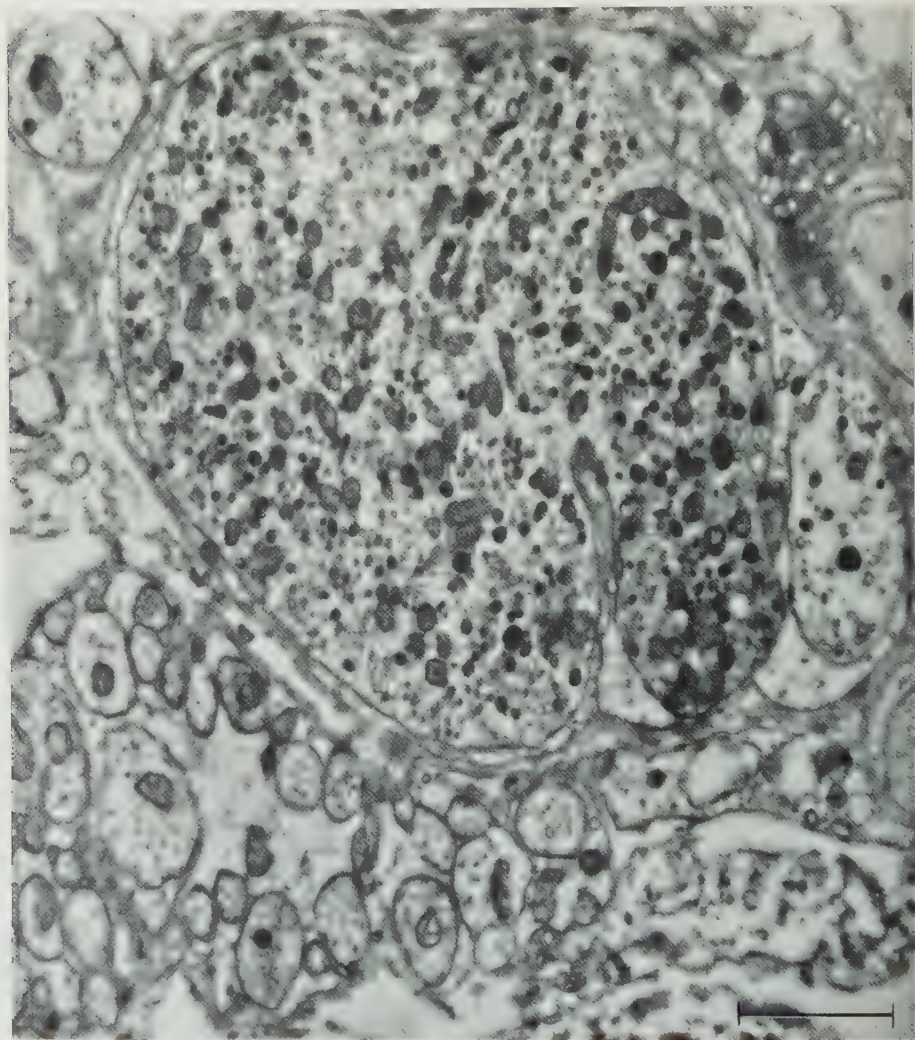


Fig. 7. Cylindraxe renflé rappelant un corps de Herring

Les rapports musculo-nerveux se traduisent au microscope électronique par deux sortes d'images:

1. Des faisceaux de neurites sont très rapprochés du sarcolemme; certains neurites incomplètement enrobés par le cytoplasme schwannien ne sont séparés de la fibre musculaire que par les basales schwannienne et sarcolemmique et, entre elles, un mince espace (Fig. 10). Les cylindraxes proches du sarcolemme contiennent de nombreuses et fines vésicules synaptiques.

2. Des neurites isolés viennent se terminer en bouton synaptique au contact de la fibre musculaire (Fig. 11). Le bouton nerveux se loge dans une encoche de la membrane plasmique qui ne présente par ailleurs aucune différenciation pouvant évoquer une structure d'organe sous-neural.

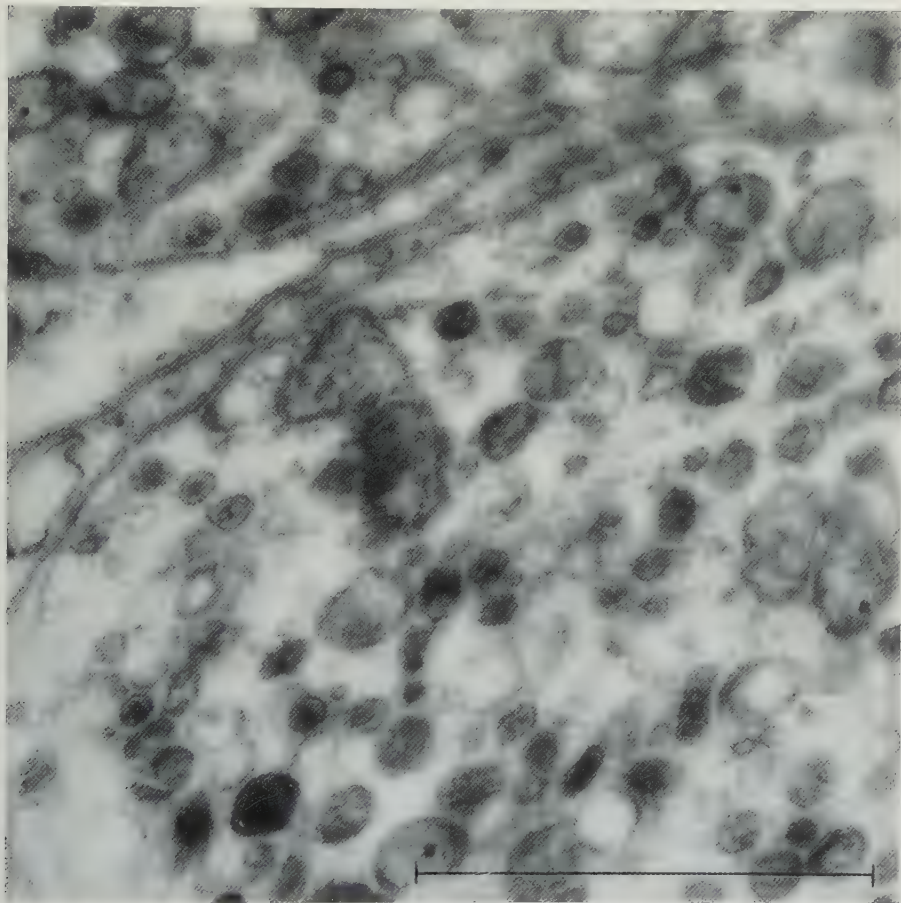


Fig. 8. Détail montrant les divers types de granules contenus dans ce renflement

Sur les préparations optiques, les techniques d'imprégnation argentique montrent l'enroulement en spirale des fibres nerveuses autour des fibres musculaires. Cette disposition se retrouve au microscope électronique (Fig. 12); les petits faisceaux nerveux suivent un trajet marqué par une dépression du sarcolemme.

C. Innervation du tissu vecteur

1. *Le noeud de Keith-Flack* est surtout innervé à sa périphérie. Il ne renferme pas plus d'éléments nerveux que les autres régions bien innervées du myocarde auriculaire.

2. *Le noeud de Tawara* est la région du coeur la plus richement innervée. L'extrême intrication entre les fibres musculaires et nerveuses est caractéristique

de cette partie du tissu vecteur (Fig. 13, 14). A la périphérie du noeud, on trouve surtout des gros faisceaux nerveux; dans la profondeur du noeud, les fibres nerveuses forment de véritables manchons autour des fibres musculaires et remplissent presque la totalité des espaces interstitiels.

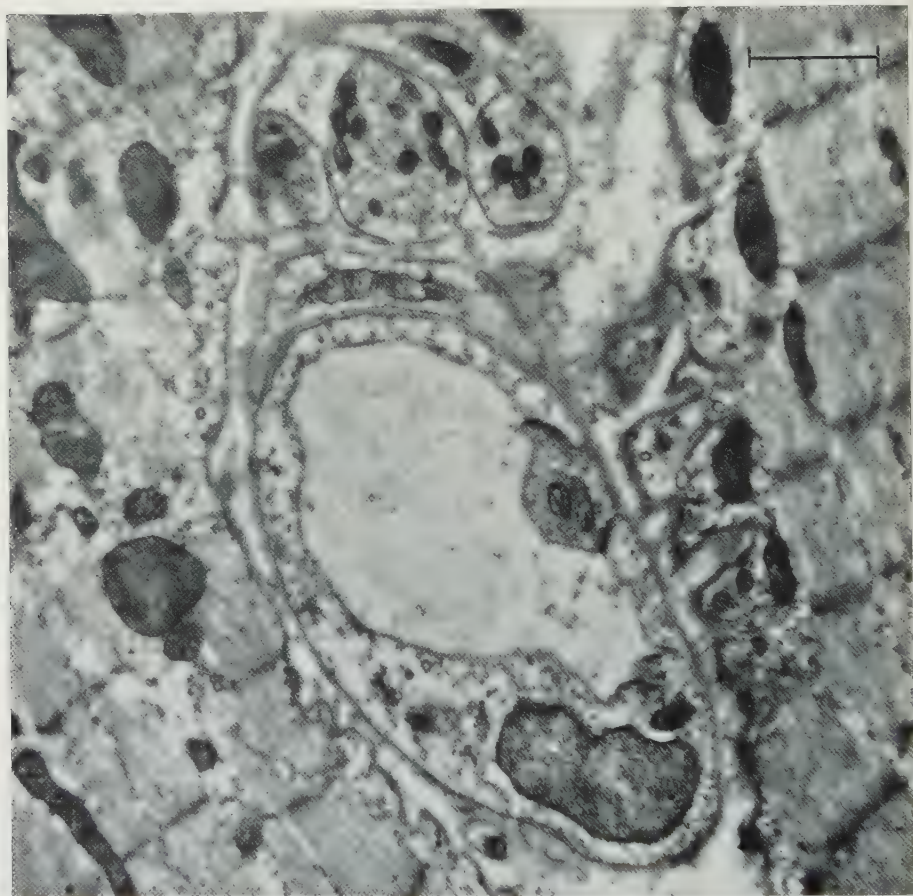


Fig. 9. Myocarde ventriculaire: fibres nerveuses en rapport avec les vaisseaux

3. *Le faisceau de His* est richement innervé, mais le long de son trajet et surtout au niveau de la bifurcation une partie des fibres nerveuses s'en éloignent pour se répartir dans la cloison interventriculaire, principalement dans la couche sous-endocardique. Les rapports musculo-nerveux sont les mêmes que dans le noeud de Tawara: les espaces interstitiels, d'ailleurs étroits, sont presque entièrement occupés par des éléments nerveux. Ceux-ci sont également nombreux dans la gaine du faisceau de His.

4. *Les branches du faisceau de His* diffèrent du point de vue de leur innervation. Les éléments nerveux abandonnent les fibres vectrices des branches au moment de leur transformation en fibres du Purkinje; la branche gauche, dont les fibres se transforment précocement en fibres de Purkinje, n'est ainsi innervée que dans son tiers supérieur, tandis que la branche droite est innervée durant une

grande partie de son trajet. Les fibres nerveuses, dans la partie innervée des branches, sont orientées parallèlement aux fibres musculaires; la disposition en spiral se retrouve plus rarement; les contacts neuro-musculaires sont moins intimes (Fig. 15).

5. *Les fibres de Purkinje* n'ont pas de rapports particuliers avec les éléments nerveux: elles ne diffèrent pas sur ce point des fibres non spécifiques du myocarde ventriculaire.

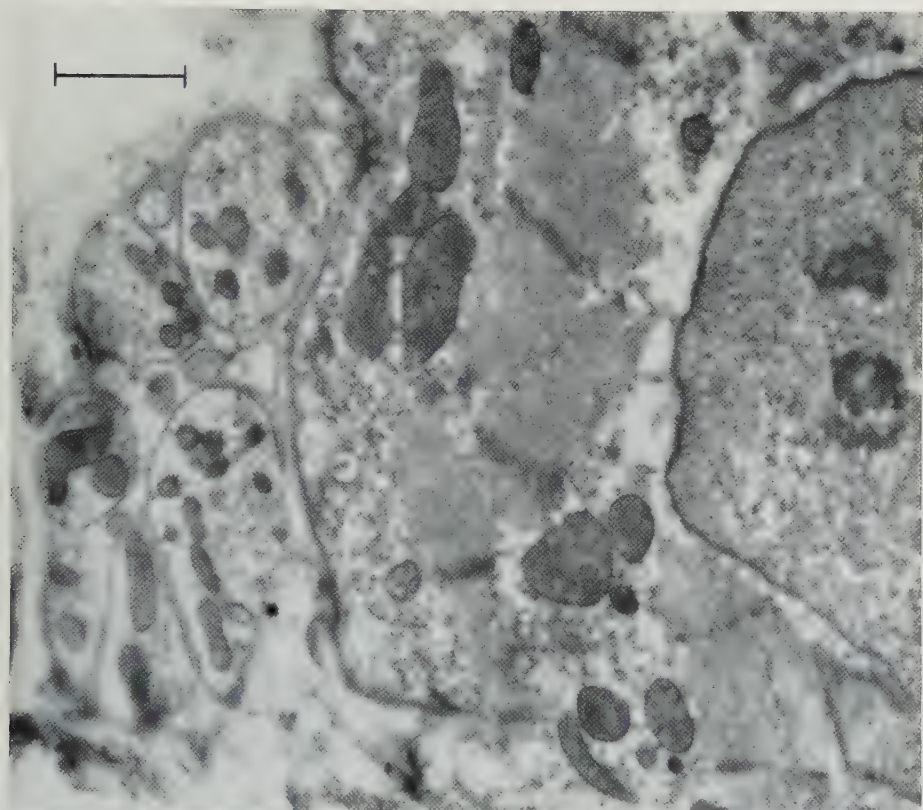


Fig. 10. Cylindraxes riches en fines vésicules proches d'une fibre musculaire

Discussion

1. Les comportement électrophysiologique du noeud de Tawara lors de l'excitation des nerfs cardiaques (d'après SANO et coll. 1959) rappelle les synapses neuro-musculaires des muscles volontaires. Nous n'avons pas trouvé dans le coeur de plaque motrice sous la forme caractéristique d'organe de Couteau. Nous avons seulement observé des contacts étroits entre fibres musculaires et nerveuses, rappelant l'innervation des muscles lisses (TAXI 1960). L'existence de nombreux cylindraxes remplis de fines vésicules et incomplètement enrobés par le cytoplasme schwannien parle en faveur d'une sécrétion diffuse de médiateurs chimiques le long des fibres et dans les espaces interstitiels. Ces images sont en accord avec la réaction diffuse de la cholinestérase le long des fibres (MOHR et GEREETZOFF

1954) et pourrait expliquer la diffusion rapide des médiateurs, démontrée par les expériences classiques de perfusion du coeur.

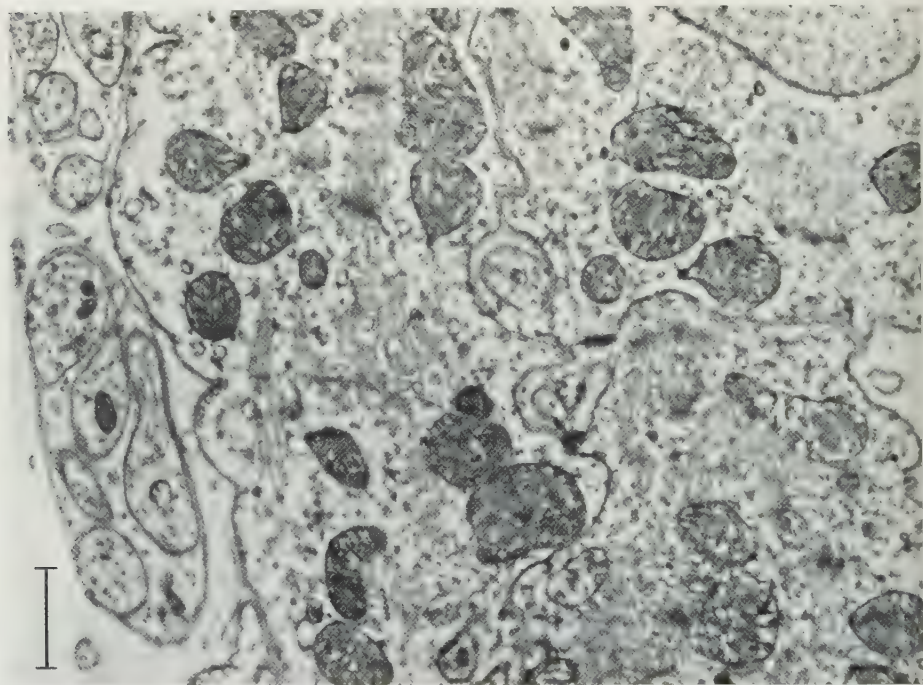


Fig. 11. Terminaison nerveuse en partie libérée de la gaine schwannienne au contact d'une fibre musculaire (au centre de l'image)

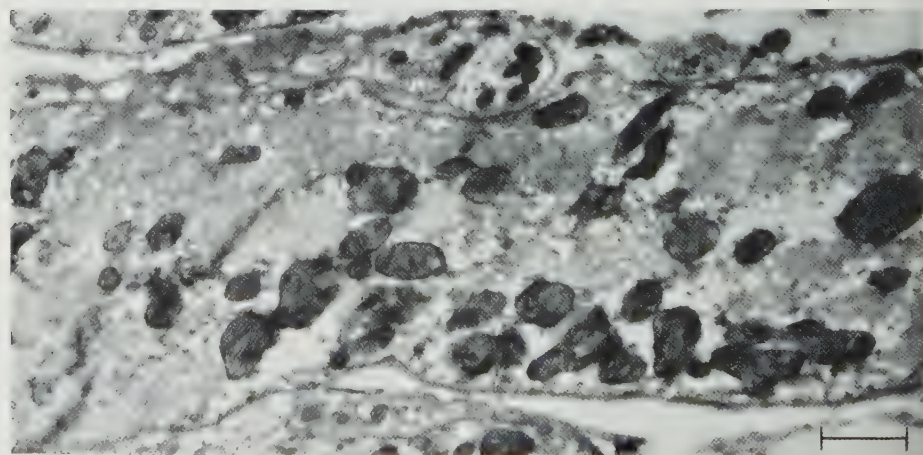


Fig. 12. Enroulement des fibres nerveuses le long des fibres musculaires

2. Le mode d'innervation du myocarde chez le rat se retrouve dans le coeur d'anguille (COUTEAU et LAURENT 1957) et de tortue (FAWCETT et SELBY 1958); il est le même dans tout le myocarde; cependant, la richesse en éléments nerveux diffère nettement selon les régions: ainsi, le tissu vecteur, dans sa partie auriculo-

ventriculaire (noeud de Tawara, faisceau de His et ses branches) est la région la plus innervée du coeur.

3. Des physiologistes ont montré que dans la région intermédiaire entre le noeud de Tawara et le faisceau de His il se produisait un retard de la transmission

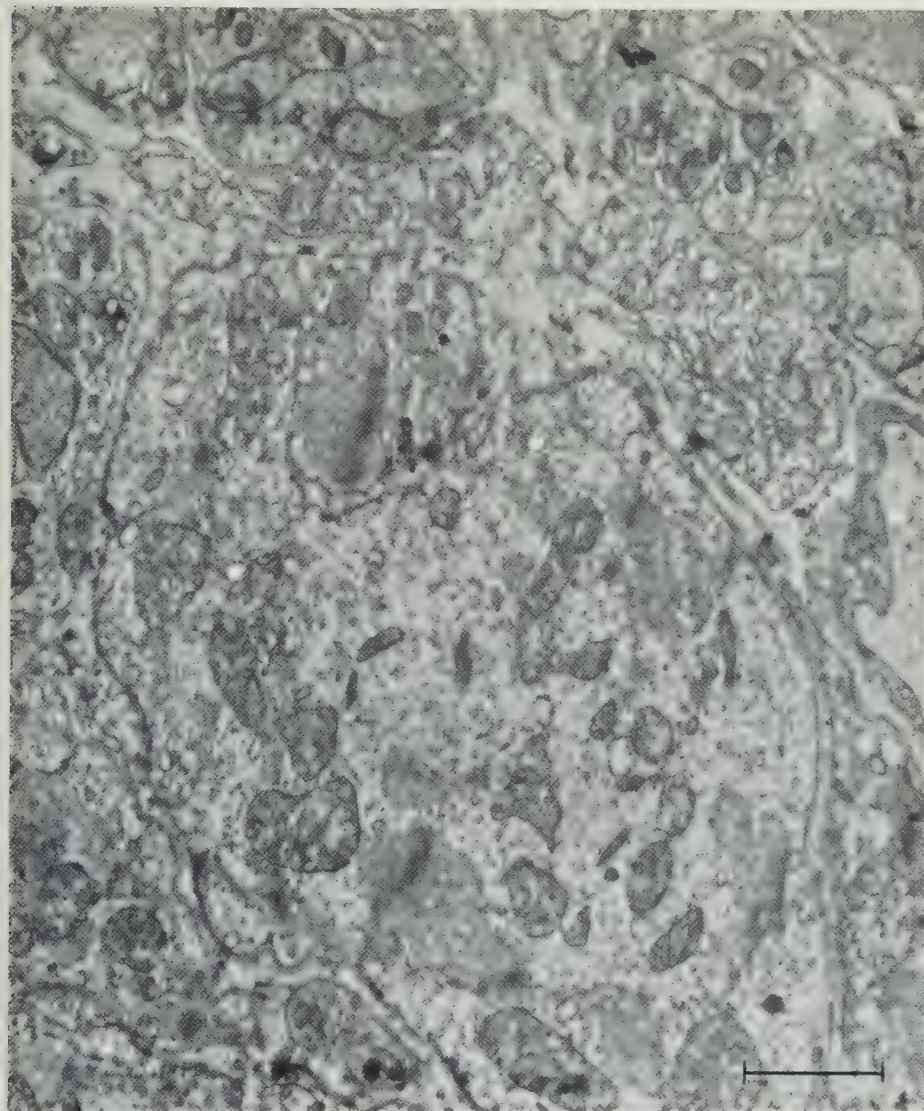


Fig. 13

Fig. 13 et 14. Rapports musculo-nerveux dans le noeud de Tawara

auriculo-ventriculaire de l'excitation cardiaque. Ils ont appelé cette zone : « région critique » (HOFFMANN et coll. 1959). Parmi les diverses explications proposées, la théorie neurogène semble la plus solide : l'excitation nerveuse expérimentale ou l'administration d'acétylcholine provoquent en effet un retard de transmission suivi d'une dissociation auriculo-ventriculaire (ALANIS et coll. 1959). Les données

morphologiques sont également en faveur de cette hypothèse: dans cette région, où la réaction de la cholinestérase est intense, nos images montrent des contacts nombreux et diffus entre fibre musculaires et nerveuses; c'est la partie du myocarde où nous avons observé la plus grande concentration en éléments nerveux.

4. Un matériel colorable à l'hématoxyline chromique de Gomori a été mis en évidence (chez le chien, le porc, le boeuf et le veau) dans les cellules ganglionnaires intra-cardiaques (KORPÁSSY 1960). Chez le rat, sur les coupes à la paraffine et sur les coupes semi-fines on retrouve la positivité au Gomori des cellules ganglion-

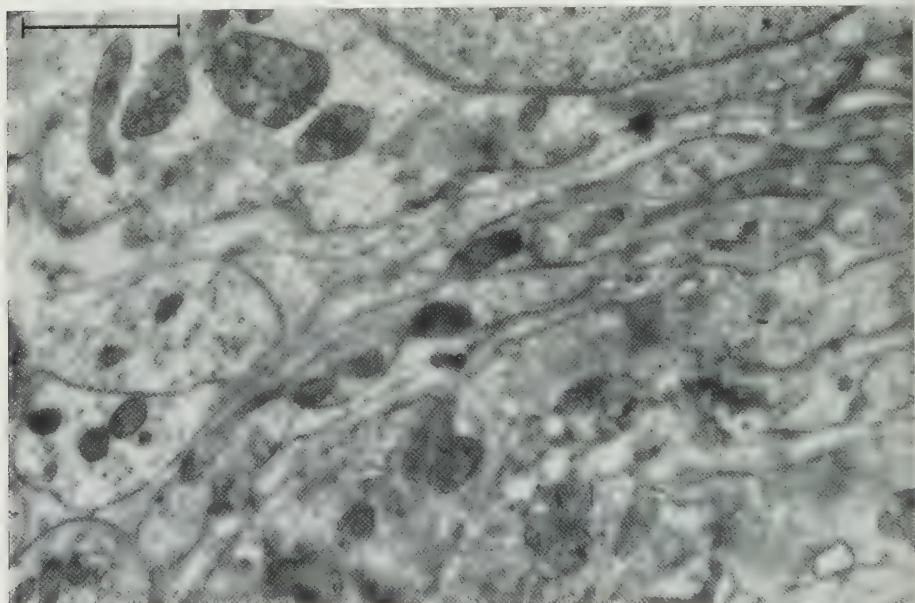


Fig. 14

naires intra-cardiaques. Les cylindraxes renfermant des structures lamellaires et des corps denses se colorent au Gomori sur les coupes semi-fines où nous avons pu les identifier. Des corps denses du même type sont, nous l'avons vu, aussi présents dans les cellules ganglionnaires. Généralement peu nombreux, ils tendent à se grouper dans certaines régions du cytoplasme. Nous avons tendance à considérer ces corps comme responsables de la coloration au Gomori. Dans les cylindraxes et dans les cellules ganglionnaires, la réaction chromaffine a été constamment négative.

5. Les granules à noyau central abondants dans les renflements cylindraxiles ont été considérés dans la médullo-surrénale comme des grains de catéchols (DE ROBERTIS et FERREIRA 1957). Nous n'avons pu retrouver ces renflements sur les préparations optiques et nous ne pouvons dire si ces corps donnent une réaction chromaffine positive. Ce type de granulation a été décrit également dans les plexus d'Auerbach (HAGERT et TAFURI 1959).

6. Les microvésicules à coeur dense retrouvées dans les cellules particulières des ganglions nerveux à l'abouchement de la veine cave supérieure ont été interprétées comme des granules de catéchols dans les éléments chémorécepteurs du corpuscule carotidien (ROSS 1959). Ces corps sont apparemment trop peu nom-

breux et trop dispersés pour pouvoir donner une réaction chromaffine nette dans les cellules que nous avons étudiées.

La signification des différents granules décrits dans les éléments nerveux du coeur ne peut être d'avantage précisée. La coloration au Gomori de certain d'entre eux ne fournit aucune indication sur leur nature. Les granules caractéristiques des cylindraxes de la posthypophyse ne représentent qu'un type de neuro-

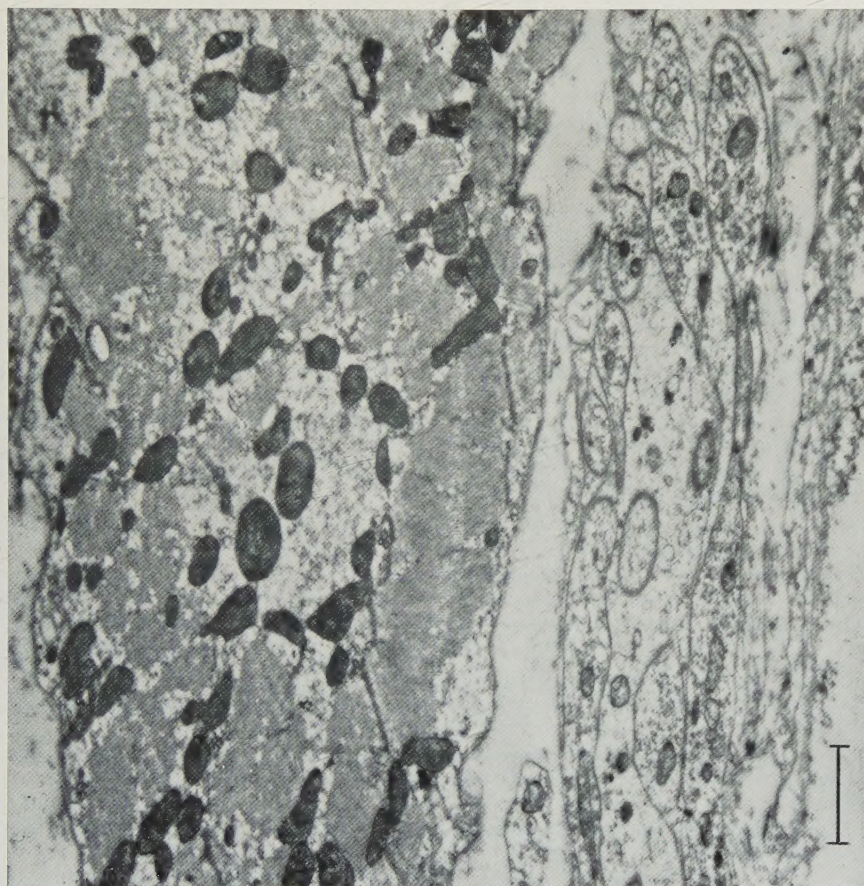


Fig. 15. Rapports musculo-nerveux plus laches dans les branches de Tawara

sécrétion. Des grains d'aspect analogue mais de nature probablement différente se retrouvent dans d'autres régions nerveuses. Nous devons nous borner actuellement à une description objective.

Conclusion

L'étude au microscope électronique des éléments nerveux intracardiaques et des rapports musculo-nerveux dans le coeur de rat nous a montré un certain nombre de particularités:

1. Dans les ganglions nerveux du sulcus terminalis, on trouve des cellules particulières proches des éléments chémorécepteurs du corpuscule carotidien. Des cylindraxes renflés rappelant les corps de Herring se rencontrent près de l'abouche-

ment de l'aorte. Ils renferment des granules comparables aux grains de catéchols de la médullo-surrénale.

2. L'innervation du myocarde paraît se faire selon deux processus: A. rapports intimes et diffus (sécrétion diffuse de médiateurs ?) entre cylindraxes en partie désenvaginés de leur enveloppe schwannienne et fibres musculaires. B. Bouton terminal venant se situer dans une encoche de la fibre musculaire. Il n'existe pas d'organe sous neural.

3. Le tissu vecteur, dans sa partie auriculo-ventriculaire, (noeud de Tawara, faisceau de His) est la région la plus innervée du coeur.

4. Nous avons établi quelques rapprochements entre nos images et certaines données physiologiques et histochimiques.

Bibliographie

- ALANIS, J., L. LOPEZ and J. PULIDO: The H potencial and the conduction velocity of the bundle of His. *J. Physiol. (Lond.)* **147**, 315—324 (1959).
- ANDERSON, E., and V. L. BREEMEN: Electron microscopic observations on spinal ganglion cells of *Rana Pipiens* after injection of malononitrile. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 83—86 (1958).
- COUTEAU, R., et P. LAURENT: Etude au microscope électronique du coeur de l'anguille: observations sur du tissu musculaire de l'oreillette et son innervation. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **245**, 2097—2100 (1957).
- DAVIES, F., E. T. B. FRANCIES and T. S. KING: Neurological studies of the cardiac ventricles of mammals. *J. Anat. (Lond.)* **86**, 130—142 (1952).
- FAWCETT, D. W., and C. C. SELBY: Observations on the fine structure of the turtle atrium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 63—71 (1958).
- HAGER, H., u. W. L. TAFURI: Electronenoptischer Nachweis sog. neurosekretorischer Elementargranula in marklosen Nervenfasern des Plexus myentericus (AUERBACH) des Meerschweinchens. *Naturwissenschaften* **46**, 332—333 (1959).
- HOFFMANN, B. F., A. PAES DE CARVALHO, W. C. MELLO and P. F. CRANFIELD: Electrical activity of single fibers of the atrioventricular node. *Circulat. Res.* **7**, 11—18 (1959).
- KING, T. S., and J. B. COAKLEY: The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man. *J. Anat. (Lond.)* **92**, 353—376 (1958).
- KORPÁSSY, B.: Neurosekretion und hypothalamische Kontrolle der adrenokortikotropen Funktion der Adenohypophyse. *Symp. Biol. hung.* **1**, 13—24 (1960).
- MOHR, E., et M. A. GEREBTZOFF: Recherches histochimiques sur les acétylcholine et cholinestérases. 3. Localisation dans le coeur des mammifères. *Acta anat. (Basel)* **22**, 143—151 (1954).
- PALAY, S. L., and G. E. PALADE: The fine structure of neurons. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 69—88 (1955).
- ROBERTIES, E., and A. FERREIRA: Electron microscope study of the excretion of catechol-containing droplets in the adrenal medulla. *Exp. Cell. Res.* **12**, 568—574 (1957).
- ROSS, L. L.: Electron microscopic observation of carotid body of the cat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 253—261 (1959).
- SANO, T., M. TASAKI and T. SIMAMOTO: Histologic examination of the origin of the action potential characteristically obtained from the region bordering the atrioventricular node. *Circulat. Res.* **7**, 700—704 (1959).
- SMITH, J. W.: „Reticular“ and „areticular“ Nissl bodies in sympathetic neurons of a lizard. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 77—83 (1959).
- TAXI, J.: Observations sur l'innervation du muscle lisse. Première Réunion Européenne d'Anatomie, Strasbourg 25 au 27 Août 1960.
- VIRÁGH, Sz., et A. PORTE: Structure fine du tissu vecteur dans le coeur de rat. *Z. Zellforsch.* (ce numéro).

Dr. Sz. VIRÁGH,

Institut d'Anatomie et d'Histologie Pathologique de l'Université Médicale,
Szeged (Hongrie), Kossuth Lajos sugárút 40

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongresssprachen abgefaßt sein kann.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.
6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonebildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonezeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.
- Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.
7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzuziehen. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.
10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.



Die Idee der Universität

Für die gegenwärtige Situation entworfen

Von KARL JASPERS, Basel, und KURT ROSSMANN, Heidelberg

VIII, 250 Seiten 8°. 1961. DM 12,—

INHALTSÜBERSICHT

Einleitung. Von KARL JASPERS: Das Bild der Universität · Die Idee der Universität. Von KARL JASPERS: Vom Wesen der Wissenschaft. Die Aufgaben der Universität. Die Einrichtung der Universität. Die Daseinsvoraussetzungen der Universität. Abschluß · Von der Notwendigkeit, den Bedingungen und den Möglichkeiten der deutschen Universitätsreform. Von KURT ROSSMANN: Einleitung (Die politische Bedeutung der Reform). Die Universität als geistige Mitte der Wissenschaftsorganisation. Die Struktur von Forschung und Lehre in der künftigen Universität. Die Struktur von Hierarchie und Verwaltung in der künftigen Universität. Die mögliche Verwirklichung der Universitätsreform · Bibliographische Hinweise.

ZUR INFORMATION

Eine Schrift gleichen Titels hat Professor JASPERS 1923 und 1946 in heute zum Teil überholten Fassungen veröffentlicht. Die Autoren haben sie nach vielen Gesprächen neu zu gestalten versucht. Geschrieben wurden die Einleitung und Teil I von JASPERS, Teil II von ROSSMANN. Die Idee ist dieselbe geblieben, die ganz veränderte Daseins-situation aber verlangt, daß ihre Erscheinung sich wandelt. Heute wird die Reform der Universität als eine für den Staat lebensentscheidende Aufgabe erkannt. Große organisatorische Vorarbeiten sind geleistet worden. Trotzdem sind viele der um die Reform bemühten Forscher und Gelehrte wie die Beauftragten der Regierungen von der Sorge bedrückt, ob es in Zukunft noch Universitäten oder unter ihrem Namen etwas ganz anderes geben wird.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG